

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin  
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung  
Direktor: Professor Dr. H. Raettig

---

VERGLEICHENDE TIERVERSUCHE ZUR  
UNSPECIFISCHEN WIRKUNG DER ORALEN IMMUNISIERUNG  
MIT ENTERITIS - ERREGENDEN SALMONELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Eva-Maria Kurschilgen geb. Formella  
aus Perleberg

Berlin 1969



Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin  
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung  
Direktor: Prof. Dr. H. Raettig

---

Vergleichende Tierversuche zur  
unspezifischen Wirkung der oralen Immunisierung  
mit Enteritis-erregenden Salmonellen

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an der  
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Eva-Maria Kurschilgen, geb. Formella  
aus Perleberg

Berlin 1969

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heinz N a u m a n n

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen R a e t t i g

Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien  
Universität Berlin

Promoviert am: 20. Juni 1969

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                    | <u>Seite</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| I. <u>Einleitung</u>                                                                               | 5            |
| 1.   Geschichtliches zur tierexperimentellen<br>Erforschung der unspezifischen Immunität           | 5            |
| 2.   Tierexperimentelle Ergebnisse zur Unspezifität bei der oralen Immunisierung gegen Salmonellen | 12           |
| 3.   Aufgabenstellung                                                                              | 13           |
| II. <u>Material und Methoden</u>                                                                   | 15           |
| 1.   Versuchstiere                                                                                 | 15           |
| 2.   Impfstoffe                                                                                    | 15           |
| 3.   Immunisierung                                                                                 | 16           |
| 4.   Infektion                                                                                     | 17           |
| III. <u>Ergebnisse</u>                                                                             | 19           |
| 1.   Orale Immunisierung mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten S. schwarzengrund-Bakterien | 20           |
| a. Spezifische Impfung                                                                             | 20           |
| b. Gruppenspezifische Impfung                                                                      | 26           |
| c. Gruppenunspezifische Impfung                                                                    | 31           |
| 2.   Orale Immunisierung mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten S. newport-Bakterien        | 37           |
| a. Spezifische Impfung                                                                             | 37           |
| b. Gruppenspezifische Impfung                                                                      | 43           |
| c. Gruppenunspezifische Impfung                                                                    | 48           |

|                                                                                                                           | <u>Seite</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| IV. <u>Diskussion</u>                                                                                                     | 53           |
| 1. Die Immunitätsreaktion nach der oralen<br>Impfung                                                                      | 53           |
| 2. Erörterung der Versuchsergebnisse hin-<br>sichtlich Spezifität und unspezifischer<br>Leistung der oralen Immunisierung | 54           |
| 3. Erörterung der Lokalisation der nach<br>oralen Impfung unspezifisch schützenden<br>Komponente                          | 61           |
| V. <u>Zusammenfassung</u>                                                                                                 | 63           |
| VI. <u>Schrifttum</u>                                                                                                     | 65           |

## I. Einleitung

### 1. Geschichtliches zur tierexperimentellen Erforschung der unspezifischen Immunität

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts, nachdem von ROBERT KOCH die Spezifitätslehre, die "Lehre von den charakteristischen konstanten Arten der Spaltpilze als Ursache verschiedener Krankheiten", aufgestellt worden war, wurde von LOUIS PASTEUR in den ersten Arbeiten über die künstliche aktive Immunisierung die Spezifität der Bakteriengifte beschrieben. PFEIFFER, KOLLE, BRIEGER, FRÄNKEL und v. WASSERMANN folgten nach 1890 mit ihren tierexperimentellen Erfahrungen über die künstliche Immunisierung (46). Die Grundlage für eine unspezifische Immunisierung schuf RICHARD PFEIFFER mit seinen exakten Forschungen über die Choleraimmunität (69), als er den Unterschied zwischen "spezifisch" und "unspezifisch", zwischen "Resistenz" und "Immunität" klärte. Zuvor hatten bereits einige Autoren mitgeteilt, daß sie nach Impfung mit artfremden Bakterien ebenso wie nach verschiedenartiger unspezifischer Behandlung von Versuchstieren eine Änderung der Immunitätslage, ja sogar eine echte Immunität beobachten konnten.

Aus den Jahren 1887 bis 1889 stammen die ersten Beobachtungen über einen wechselseitigen Impfschutz. ROUX und CHAMBERLAND machten am "Institut Pasteur" in Schutzversuchen an Meerschweinchen die Erfahrung, daß diese auch gegen die "Bazillen des malignen Ödems" geschützt waren, wenn sie zuvor gegen Rauschbrand unempfindlich gemacht worden waren, umgekehrt jedoch gingen die gegen malignes Ödem geschützten Tiere an Rauschbrand zugrunde (82). HUEPPE und WOOD prüften für Hühnercholera und Milzbrand die Beziehungen zu artverwandten Bakterien: Wurden Mäuse

mit harmlosen verwandten Bakterien geimpft, so stellte sich bei nachfolgender Infektion mit Milzbrandbazillen eine Schwächung der sehr virulenten Erreger im Organismus der behandelten Tiere ein. Der Erfolg der Impfung war abhängig von der verwendeten Impfdosis und der Virulenz der Infektionskeime (34). Eine Steigerung der allgemeinen Abwehrreaktion des Organismus stellte WOOLDRIDGE nach Injektion mit verschiedenen Organextrakten fest (100). 1890 beobachtete v. BEHRING bei Tierversuchen über das Zustandekommen der Diphtherieimmunität nach Vorbehandlung von Kaninchen und Meerschweinchen mit Wasserstoffsuperoxyd einen geringen Immunitätsgrad; KITASATO immunisierte Kaninchen gegen Tetanus durch Vorbehandlung mit Jodtrichloridlösung (2).

In demselben Jahr berichten BUCHNER, v. BEHRING und NISSEN (8, 1) erstmalig über die bakteriziden Eigenschaften des Blutserums des tierischen Organismus. BUCHNER meint, daß jedes Serum einen qualitativ gleichen antiseptischen Schutz enthält, dessen Wirksamkeit an die Eigenschaften des strömenden Blutes gebunden ist und außerhalb des Körpers allmählich erlischt. 1893 erkennt BUCHNER in den Alexinen, wie er sie erstmals nennt (11), antibakteriell wirksame, im Serum von Tier und Mensch enthaltene, nur gegen bestimmte Bakterienarten wirksame Eiweißkörper, die gleichzeitig auch auf die Blutkörperchen anderer Tierarten vernichtend wirken. GRUBER sieht die Aufgabe dieser unspezifischen, stets im Blut vorhandenen Alexine in der Abtötung der Bakterien, die dann durch die spezifischen Antikörper des Blutes, deren Wirkung sich aber auch auf nah verwandte Bakterienarten erstreckt, agglutiniert werden (30, 31). von PFEIFFER wird 1895 hierzu berichtet, daß normales und von immunisierten Tieren stammendes Serum eine nicht streng spezifische abtötende Wirkung auf virulente Bakterien im Organismus, aber nicht in vitro, hat (68). SANARELLI hält ebenfalls die Serumwirkung immunisierter Tiere für "nicht spezifisch, sondern allgemein, wechselseitig und in ihrem Grad von der Virulenz der benutz-

ten Bakterienart abhängig" (85).

1887 wurde PAWLOWSKY durch Virchow veranlaßt, eine Abhandlung über die Heilung des Milzbrandes durch Erysipel- und Pneumoniekokken zu schreiben (64). Er nennt sie "bacterio-therapeutische Versuche". Schon ein Jahr zuvor zeigte EMMERICH (19), daß Milzbrand durch Einimpfung von Erysipelkokken bei Kaninchen geheilt werden kann. Die Ursache hierfür sieht er in einer Aktivierung der zellularchemischen Vorgänge im Organismus durch die Kokken, die schon nach wenigen Stunden zur Vernichtung der Milzbrandbazillen führt. Auch die Tuberkulose der Kaninchen versucht er durch künstliche Erysipelinfektion zu beeinflussen. EMMERICH erwägt sogar die Heilung der menschlichen Tuberkulose durch Erysipelserum (22). RUMPF zeigt am Menschen selbst, daß Abdominaltyphus nicht nur mit abgetöteten Typhusbakterien, sondern auch mit abgetöteten Kulturen von *Bazillus pyocyaneus* erfolgreich behandelt werden kann. Er glaubt, daß durch Einführung der fremden Bakterien die natürlichen, bakterienfeindlichen Schutzkräfte des Körpers angeregt werden, wodurch der Typhus in seinem Verlauf abgeschwächt wird (83). Auch BUCHNER beschäftigte sich mit der Heilung von Infektionskrankheiten durch heterologe Bakterienarten (10). Er betrachtet die Heilung von Infektionskrankheiten als speziellen Fall der Immunisierung. Die Heilung erfolgt, nach seiner Meinung, "unter dem Bild der entzündlichen Reaktionen", die durch die beim Untergang von Bakterienzellen freiwerdenden Bakterienproteine bewirkt werden. Durch Verimpfung von harmlosen Bakterien, auch als sterilisierte Kulturen, kann daher durch Provokation einer entzündlichen Reaktion ein gewisser Schutz und sogar Heilung gegen gefährlichere Erreger erzielt werden. PAWLOWSKY beschreibt 1894 als Ursache der unspezifischen Heilung des Milzbrandes durch Proteine eine verstärkte Phagozytose (65). Als EMMERICH und LÖW 1898 ein bakteriolytisches Bakterienenzym

finden, das außer der eigenen Bakterienart auch andere pathogene Arten auflösen konnte, versuchten sie verschiedene Infektionskrankheiten durch das Enzym des *Bazillus pyocyaneus* zu heilen (23).

Vor allem mit Typhus-, Coli- und Cholerabakterien wurde von verschiedenen Untersuchern in wechselseitigen Immunisierungsversuchen die Spezifität der Bakteriengifte geprüft, wobei die einzelnen Autoren oft zu widersprüchlichen Aussagen gelangten. SANARELLI untersuchte als erster 1892 am Institut Pasteur die Möglichkeiten eines wechselseitigen Impfschutzes mit Coli- und Typhusbakterien an Meerschweinchen. Da sich beide Bakterienarten reziprok vertreten konnten, hielt SANARELLI ihre Gifte für biologisch äquivalent (84). LÖFFLER und ABEL fanden später aber nur einen etwas erhöhten Schutz gegenüber der heterologen Bakterienart, den sie durch die Familienverwandtschaft der verwendeten Arten erklärten (51). NEISSER widerlegte experimentell SANARELLI's Ergebnisse, als er mit mehrfach tödlicher Dosis infizierte (60). Ebenfalls 1892 versuchte HUEPPE die Spezifität des Choleragiftes zu widerlegen. Er erzielte durch Impfung mit unterschiedlichen Bakterien "allgemeine Giftwirkungen", die die Tiere gegen Cholera schützten (32). KLEIN gelang ein Jahr später durch intraperitoneale Vorbehandlung mit verschiedenen Bakterienarten eine "Choleragiftfestigkeit". Da die einzelnen Arten bei den Versuchstieren zu gleichen Krankheitssymptomen führten, schloß KLEIN auf eine Identität der intrazellulären Gifte (40). SOBERNHEIM prüfte KLEIN's Ergebnisse und konnte sie vollauf bestätigen (89), ebenso BONHOFF (6), der durch Vorbehandlung mit verschiedenen Vibrionenarten noch nach drei bis vier Wochen einen Schutz gegenüber der nachfolgenden Cholerainfektion feststellen konnte. Auch nach einer Impfung mit Cholerabakterien waren die Tiere für längere Zeit gegen andere Keime geschützt. In England knüpften KANTHACK und WESBROOK an KLEIN's Versuche an (99), bezweifelten aber seine Ansicht von der

Gleichwertigkeit der intrazellulären Gifte. 1894 folgten PFEIFFER und ISSAEFF mit ihren Tierexperimenten über die Choleraimmunität. Sie traten für die Spezifität des Choleragiftes ein, da sie durch Vorbehandlung mit fremden Bakterienarten nur einen vorübergehenden Schutz von kurzer Dauer erhielten, während die Choleraimpfung eine echte Immunität gegen die spezifische Infektion erzeugen konnte (69). PFEIFFER beschrieb diesen Schutz als eine lokale, auf starker Leukozyteninfiltration beruhende Resistenz, einen Zustand, wie ihn ISSAEFF schon nach Injektion von steriler Bouillon, physiologischer Kochsalzlösung, Harn, normalem Blutserum u. a. beobachten konnte (35). Auch die tierexperimentellen Ergebnisse von ROUX (81), die eine wechselseitige Immunität zwischen Tetanus, Tollwut und Schlangengift erbracht hatten, wurden von PFEIFFER widerlegt. Nach wiederholter Überprüfung ihrer Versuche gelangten auch WESBROOCK und KANTHACK (98) zu der Ansicht, in Übereinstimmung mit SOBERNHEIM (90), daß die Immunität für jede Bakterien-Spezies spezifisch ist. Der Impfschutz, den sie durch Vorbehandlung mit heterologen Bakterien erhielten, währte höchstens 14 Tage im Gegensatz zur langanhaltenden Wirkung nach spezifischer Impfung. SOBERNHEIM sah den nach unspezifischer Behandlung auftretenden Schutz in einer gesteigerten Aktionsfähigkeit des gesamten Organismus, der von PFEIFFER als "allgemeine Leukozytose" bezeichnet wurde.

Nachdem nun der Unterschied zwischen Immunität und unspezifischer Infektabwehr geklärt war, versuchten andere Autoren durch verschiedenartigste Mittel eine Steigerung der unspezifischen Immunität zu erzeugen. Man erkannte außerdem, daß sich durch unspezifische Stoffe bei natürlich infizierten oder spezifisch vorbehandelten Tieren auch eine Steigerung der spezifischen Immunitätsreaktionen bewirken ließ. Diese wurde als unspezifische Immunisierung aufgefaßt, da durch unspezifische Beeinflussung eine Erhöhung der spe-

zifischen Zelleistungen erreicht wurde, z. B. wurden bei früher immunisierten Tieren eine gesteigerte Antikörperbildung nach Injektion von Pilocarpin (1905 ROSTOSKI), Antipyretika (LÜDKE 1909), heterologen Bakterienarten (CONRADI und BIELING 1918, TSUKAHARA 1921), Nukleinsäure und Deuteroalbumose (WEICHARDT und SCHRADER 1919, JAGGI 1922) und Gelatine (OTAKI 1921) festgestellt (80, 5, 92, 97, 36).

Seit dem "KOCH'schen Grundversuch" 1891 ist bekannt, daß chronische Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Syphilis und Lepra dem Organismus Schutz gegenüber dem Manifestwerden von Neuinfektionen gewähren. Eine Superinfektion geht nicht an. Von SERGENT, PARROT und DONATIEN wurde 1924 für diesen Zustand der Ausdruck "Prémunition" eingeführt (87), meist wird er als "Infektionsimmunität" bezeichnet. MORGENROTH, BIBERSTEIN und SCHNITZER glaubten 1920 eine neue Art von Immunität gefunden zu haben, als sie bei chronisch mit Streptokokken vorinfizierten Versuchstieren nach Superinfektion mit verschiedenen Streptokokken-Stämmen einen Schutz gegen die tödliche Dosis feststellten, der bereits wenige Stunden nach der Erstinfektion vorhanden war und nach etwa sieben Tagen erlosch (58, 59). Sie nannten diesen Zustand "Depressionsimmunität", da sie eine "Depression der Virulenz" des zur Superinfektion verwendeten Stammes annahmen. Für Viruserkrankungen wies 1936 als erster MAGRASSI nach, daß durch eine Superinfektion außerdem der Ablauf der Primärinfektion unterdrückt wird, "Phänomen von MAGRASSI", später "Interferenzphänomen" genannt (54). DOERR bezeichnete ein Jahr später diese Erscheinung als "Konkurrenz der Infektionen" (18).

Von OERSKOV und KAUFFMANN wurde 1937 an den ersten Tagen nach erfolgter Impfung oder Infektion ein schnell auftretender und rasch abklingender unspezifischer, nicht passiv übertragbarer Schutz

beobachtet, dem sie den Namen "Promunität" gaben (62). BRANDIS beschrieb 1954 die Promunität als speziellen Fall der gesteigerten Abwehrfähigkeit des Organismus (7). Er deutete sie als einen unspezifischen, durch bestehende Infektion erworbenen Schutz gegen eine Superinfektion, der schon wenige Stunden nach Erstinfektion ausgebildet ist und sich nur über einige Tage erstreckt.

## 2. Tierexperimentelle Ergebnisse zur Unspezifität bei der oralen Immunisierung gegen Salmonellen

Durch die zunehmende Verseuchung mit Enteritis-erregenden Salmonellen in allen Ländern mit hohem Lebensstandard angeregt, untersuchte KINNE-SAFFRAN im Tierversuch an der Maus die Möglichkeiten einer wirksamen Immunprophylaxe gegen Salmonella-Infektionen (39). Als erstes mußte die Mäusepathogenität und im Zusammenhang damit der erforderliche Impf- und Infektionsmodus für die Salmonellen der Enteritis-Gruppe, die beim Menschen eine lokale Infektion mit gastro-enteritischen Erscheinungen erzeugen können, geklärt werden. Mit zwölf verschiedenen Salmonella-Arten, die damals von der Salmonella-Zentrale in Deutschland am häufigsten registriert wurden, gelang es nicht, die gewählten Versuchstiere auf oralem, dem natürlichen Infektionsmodus bei Mensch und Tier entsprechenden Weg zu infizieren. Durch intraperitoneale Infektionsbelastung wurden unterschiedlich hohe Mortalitätswerte erreicht, die bei den einzelnen Vertretern der B-, C- und E-Gruppe des Kauffmann-White-Schemas zwischen 0 und 100 % betrugen. Es zeigte sich, daß gerade die für den Menschen hochinfektösen Salmonellen für die Maus nur gering pathogen waren. KINNE-SAFFRAN wählte je zwei Serotypen aus den Gruppen B und C/2 mit hoher Mäusepathogenität aus und prüfte mit diesen die Möglichkeit einer spezifischen oralen Immunisierung der Maus. Die Tiere waren nach der oralen Impfung gegen eine intraperitoneale Infektion signifikant geschützt.

### 3. Aufgabenstellung

Da es bei der Vielzahl der bereits bekannten Enteritis-erregenden *Salmonella*-Arten nicht möglich ist, für eine Immunprophylaxe alle Erreger zu berücksichtigen, stellte ich mir die Aufgabe, auf den Ergebnissen von KINNE-SAFFRAN aufbauend, die *Salmonellen* der Enteritis-Gruppe in vergleichenden, oralen Immunisierungsversuchen auf ihren nicht-erregerspezifischen Impfschutz zu prüfen.

In der Literatur fand ich nur wenige Angaben, die auf einen spezies-unspezifischen Schutz nach oraler Impfung mit *Salmonellen* hinwiesen. 1909 wird von YOSHIDA beschrieben, daß Mäuse nach oraler Immunisierung mit *S. paratyphi B* nicht nur gegen die spezifische Infektionsbelastung, sondern auch gegen eine Infektion mit den heterologen *S. typhi murium*-Bakterien geschützt waren (101).

RAETTIG konnte diese Beobachtung 1964 am Modell der *S. typhi murium*-Infektion der Maus bestätigen. Es wurde vergleichend oral mit *S. typhi murium*, *S. enteritidis*, einer Orovaccine gegen Typhus und Paratyphus B und einem Keuchhusten-Impfstoff geimpft. Die mit der Orovaccine behandelten Tiere waren auch gegen eine orale Infektion mit *S. typhi murium* geschützt. Im Kreuzversuch nach Verimpfung von nichtvermehrungsfähigen *S. enteritidis*- und *S. typhi murium*-Bakterien blieb der Impferfolg sogar nicht wesentlich hinter der Leistung der spezifischen Impfung zurück (76). Auch die tierexperimentellen Befunde von JANDL sprechen für einen nicht-erregerspezifischen Impfschutz nach oraler Immunisierung (37). Mit *S. typhi*, *S. anatum* und *E. coli* geimpfte Mäuse waren gegen eine nachfolgende orale Infektion mit *S. enteritidis*-Bakterien geschützt.

Diese Ergebnisse beweisen, daß durch die orale Impfung mit inaktivierten *Salmonellen* neben der von den somatischen Antigenen bestimmten spezifischen Immunität ein zusätzlicher, weitgehend un-

spezifischer Schutz erreicht werden kann. Da die Frage der Unspezifität für eine praktische Durchführung einer Immunprophylaxe gegen die Salmonella-Infektionen von ausschlaggebender Bedeutung ist, unternahm ich den Versuch, das Problem der Unspezifität am Modell der intraperitonealen Infektion der Maus nach vorheriger oraler Immunisierung zu klären. Zur oralen Impfung wurden die beiden für die Maus auf natürlichem Weg apathogenen *S. schwarzengrund* und *S. newport* aus den Gruppen B und C/2 als hitzeinaktivierte und vermehrungsfähige Impfstoffe verwendet. Der Impfschutz wurde durch Infektion mit der homologen Art, einer gruppenspezifischen und einer gruppenunspezifischen Salmonella-Spezies geprüft, um genaue Kenntnis über die Spezifität des Impfschutzes und seiner Abhängigkeit vom zugeführten Antigen zu erhalten. In Abänderung der oben beschriebenen unspezifischen Immunisierungsversuche anderer Autoren, die oral mit virulenten Keimen infizierten, mußte ich die Infektionsbelastung intraperitoneal vornehmen. Durch diese unphysiologische Einschwemmung der virulenten Keime in den Organismus erhoffte ich aber, Näheres über Art und Lokalisation der unspezifischen Schutzkomponente nach oraler Impfung zu erfahren. Es war also zusätzlich die Frage zu untersuchen, ob und gegebenenfalls in welcher Weise sich der durch die intraperitoneale Belastung geprüfte Schutz von dem durch orale Infektion geprüften unterscheidet.

## II. Material und Methoden

### 1. Versuchstiere

Zu den Tierversuchen wurden insgesamt 2948 weiße NMRI (Naval Medical Research Institute) - Mäuse vorwiegend männlichen Geschlechts aus der Zucht des Robert Koch-Institutes Berlin verwendet, deren Gewicht bei Versuchsbeginn etwa sechzehn Gramm betrug. Sie wurden in Plastikkäfigen zu je 25-30 Tieren untergebracht und während der Versuchsdauer mit dem Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser ernährt. Für jeden Versuch wurde das Tiermaterial in drei gleichgroße Gruppen aufgeteilt, wobei die dritte als Kontrollgruppe unbehandelt blieb. Alle an den Versuchen beteiligten Mäuse lebten unter den gleichen äußeren Versuchsbedingungen.

### 2. Impfstoffe

Für die Impfstoffherstellung zur Durchführung der beiden Versuchsgruppen wurden aus der Gruppe B S. schwarzengrund und aus der Gruppe C/2 S. newport ausgewählt, zwei Salmonella-Arten, die oral gegeben für die Maus apathogen sind und bei intraperitonealer Zufuhr von  $10^8$  virulenten Keimen etwa 95 % der Mäuse töten.

Je drei Stämme einer Salmonella-Spezies wurden gemeinsam zur Herstellung eines monovalenten Impfstoffes verwendet: von S. schwarzengrund die Stämme 3572, 5599 und ein gebräuchlicher Laborstamm, von S. newport die Stämme 6075, 6350 und ein Laborstamm ohne nähere Bezeichnung. Alle Salmonella-Kulturen stammten aus dem TPE-Labor des Robert Koch-Institutes.

Von den beiden Salmonella-Arten wurden jeweils zwei verschiedene Impfstoffe hergestellt, die vermehrungsfähige bzw. hitzeabgetötete Keime enthielten.

Zuerst wurden die Stämme auf 4 %igen Agar überimpft und 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt, anschließend mit der Öse abgeimpft und zur Anreicherung in Nährbouillon gegeben. Von dieser Brühekultur wurden je 10 ml auf eine große Agarschale getropft und nach weiteren 24 Stunden Bebrütungsdauer bei 37°C mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung ( $p_H = 7,2$ ) abgeschwemmt. Die drei Stämme jeder Art wurden zu gleichen Teilen miteinander zu einem Impfstoff gemischt. Hiervon wurde eine Keimzählung angelegt und zur Einstellung des Titors auf  $10^9$  Keime/ml entsprechend mit NaCl-Lösung verdünnt. Diese vollvirulente Bakterienaufschwemmung wurde als vermehrungsfähiger Impfstoff verwendet.

Zur Inaktivierung der Keime wurde der Impfstoff im Thermostaten bei 60°C 75 Minuten lang erhitzt und anschließend einer sorgfältigen Sterilitätskontrolle unterzogen, um eventuell überlebende Erreger aufdecken zu können. Etwa 0,5 ml des hitzeabgetöteten Impfstoffes wurden in Nährbouillon 10 Tage lang im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Die Keimzahl dieses inaktivierten Impfstoffes betrug ebenfalls  $10^9$  Keime/ml.

### 3. Immunisierung

Der Impfstoff wurde den Versuchstieren oral mit der Sonde zugeführt. Zwei etwa gleichgroße Tiergruppen wurden an zehn aufeinanderfolgenden Tagen mit vermehrungsfähigen oder hitzeabgetöteten Bakterien behandelt. Jede Maus erhielt täglich 0,25 ml des Impfstoffes, also insgesamt  $2,5 \times 10^9$  Keime.

Beide Tiergruppen zeigten im Vergleich zu den nichtgeimpften Kontrollmäusen keine erkennbaren Zeichen einer Schädigung ihres Gesundheitszustandes.

#### 4. Infektion

Der Impferfolg wurde durch intraperitoneale Infektionsbelastung der Versuchstiere geprüft. Die Infektion der Mäuse wurde vergleichend mit der homologen, zur Impfung benutzten Salmonella-Art und mit heterologen Keimen einer Spezies derselben und einer fremden Gruppe des Salmonellen-Schemas vorgenommen.

Für die Herstellung der zur Infektion benutzten Bakterienkulturen wurden von *S. schwarzengrund* und *S. newport* dieselben Stämme wie zur Impfstoffherstellung verwendet, von *S. heidelberg* (Gruppe B) die drei Stämme 6363, 6386 und ein Laborstamm, von *S. blockley* (Gruppe C/2) die drei Stämme 6248, 6476 und der gebräuchliche Laborstamm ohne nähere Bezeichnung aus dem TPE-Labor des Robert Koch-Institutes.

Etwa 30 Stunden bevor die Infektion der Mäuse erfolgen sollte, wurden die drei Stämme jeder Spezies auf Agarplatten frisch überimpft und anschließend bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Danach wurden die Kulturen mit der Öse abgeimpft und zur Anreicherung in Fleischwasserbouillon übertragen, die 5-7 Stunden bebrütet und anschließend den Mäusen in einer Menge von 0,1 ml (=  $10^8$  Keime) intraperitoneal injiziert wurden. Diese Infektionsdosis genügte, um bei den Kontrolltieren je nach Art des verwendeten Infektionsmaterials eine Endmortalität von 85-100 % zu erreichen.

Der Infektionstermin wurde auf den 8. bis 10. Tag nach der letzten Impfung festgelegt, da nach tierexperimentellen Erfahrungen mit Mäusen der Impfschutz schon etwa 12 Tage nach der letzten Impfung langsam wieder abnimmt.

Die Tiere wurden 12 Tage lang nach der Infektion beobachtet und die Sterbefälle registriert. Die Versuche wurden also am 12. Tag

nach der Infektion abgeschlossen, wenn nur noch vereinzelt Mäuse starben.

Um sicherzugehen, daß die Salmonellen-Infektionen den Tod der Mäuse herbeigeführt hatten, wurde von sezierten Mäusen Herzblut entnommen und auf Endo-Agar ausgestrichen, um schon optisch eine eventuelle Coli-Infektion aufdecken zu können. Nach 24stündiger Bebrütung wurde die serologische Untersuchung der gewachsenen Bakterienkulturen mit den spezifischen Immunseren vorgenommen.

### III. Ergebnisse

In zwei Versuchsgruppen, in denen ich weiße Mäuse oral mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten *S. schwarzengrund*- und *S. newport*-Bakterien immunisierte und vergleichend artspezifisch, gruppenspezifisch und gruppenunspezifisch intraperitoneal infizierte, sollte die Frage geklärt werden, ob und in welchem Maße eine unspezifische orale Impfung zu schützen vermag. Ich erhielt also in jeder Versuchsgruppe die Ergebnisse für eine spezifische, eine gruppenspezifische und eine unspezifische Impfung.

Die einzelnen Versuche wurden zeitlich aufeinanderfolgend durchgeführt, wobei die Dosierung der zur Immunisierung und Infektion verwendeten Bakterienaufschwemmungen, der zeitliche Abstand zwischen letzter Impfung und Infektion mit anschließender Beobachtung der Sterbefälle sowie die äußeren Bedingungen der Tierversuche konstant gehalten wurden.

Der Impferfolg wurde ausschließlich an der Überlebensrate der infizierten Immuntiere im Vergleich zu den nichtgeimpften Kontrolltieren festgestellt. Die Differenzen zwischen den Endmortalitätswerten der einzelnen Tiergruppen bei Versuchsabschluß wurden als entscheidendes Kriterium für den Impfschutz angesehen und statistisch nach KOLLER ausgewertet (47). Einen empfindlicheren Maßstab für eine nachweislich erfolgte Schutzwirkung erhielt ich durch die Berechnung der mittleren Überlebenszeiten für geimpfte und unbehandelte Tiere.

Nach erfolgter Infektion beobachtete ich bei den *Salmonella*-Arten der beiden von mir geprüften Gruppen einen unterschiedlichen Infektionsverlauf. Die beiden Vertreter der B-Gruppe *S. schwarzengrund* und *S. heidelberg* bewirkten eine akute, toxische Infektion,

der fast alle nicht geimpften Tiere innerhalb von 48 Stunden erlagen. Mit einer langsam ansteigenden Kurve der Sterbefälle reagierten die mit den Vertretern der C/2/Gruppe *S. newport* und *S. blockley* infizierten Mäuse, bei denen es offensichtlich erst noch zu einer Vermehrung der Keime im Organismus gekommen war.

#### 1. Orale Immunisierung mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten *S. schwarzengrund*-Bakterien

Die erste Versuchsgruppe wurde mit insgesamt 1419 Mäusen durchgeführt. Die Versuchsanordnung war dreiteilig, da nach erfolgter Impfung mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten *S. schwarzengrund*-Bakterien (Serotyp 1, 4, 12, 27:d:1, 7) mit der homologen Spezies, der gruppenspezifischen *S. heidelberg* (Serotyp 1, 4, 5, 12:r:1, 2) und der unspezifischen *S. newport* (Serotyp 6, 8:e, h:1, 2) infiziert wurde.

In den Tabellen 1-3 sind die Ergebnisse der einzelnen Versuche, nach den drei Versuchsansätzen geordnet, zahlenmäßig zusammengestellt. In Summen- und Epidemiekurven wird in den Abbildungen 1-6 der Sterblichkeitsverlauf während der Versuchsdauer für die Tierexperimente der ersten Versuchsgruppe graphisch dargestellt.

##### a. Spezifische Impfung

Um die Leistung der unspezifischen Immunisierung bewerten zu können, wurde im Vergleich zur nicht-erregerspezifischen Infektionsbelastung eine intraperitoneale Infektion mit der homologen *Salmonella*-Spezies durchgeführt. Die Tabelle 1 enthält die Zahlenangaben der vier Einzelversuche und ihre Zusammenfassung zur spezifischen Impfung mit *S. schwarzengrund*, zu der insgesamt 472 Mäuse verwendet wurden. Ein Vergleich der Endmortalitätswerte

Tabelle 1

Spezifische Impfung mit S. schwarzengrund

Die Zahlen der Immunisierungsversuche mit vermehrungsfähigen (Versuch A) und hitzeinaktivierten (Versuch B) S. schwarzengrund-Bakterien und spezifischer Infektionsbelastung

A: Orale Impfung mit vermehrungsfähigen Bakterien

|          | Geimpfte Tiere |                      |      | Kontrolltiere |                      |       |                    |
|----------|----------------|----------------------|------|---------------|----------------------|-------|--------------------|
| Vers.Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in % | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in %  | Wirkungs-<br>index |
| 1        | 48             | 25                   | 52,1 | 55            | 53                   | 96,4  | 46,0               |
| 2        | 40             | 26                   | 65,0 | 44            | 44                   | 100,0 | 35,0               |
| 3        | 27             | 12                   | 44,4 | 29            | 27                   | 93,1  | 52,3               |
| 4        | 26             | 5                    | 19,2 | 43            | 38                   | 88,4  | 78,4               |
| Summe    | 141            | 68                   | 48,2 | 171           | 162                  | 94,8  | 49,2               |

B: Orale Impfung mit hitzeinaktivierten Bakterien

|          | Geimpfte Tiere |                      |      | Kontrolltiere |                      |       |                    |
|----------|----------------|----------------------|------|---------------|----------------------|-------|--------------------|
| Vers.Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in % | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in %  | Wirkungs-<br>index |
| 1        | 48             | 26                   | 54,2 | 55            | 53                   | 96,4  | 43,8               |
| 2        | 42             | 34                   | 80,9 | 44            | 44                   | 100,0 | 19,1               |
| 3        | 29             | 17                   | 58,6 | 29            | 27                   | 93,1  | 37,1               |
| 4        | 41             | 29                   | 70,7 | 43            | 38                   | 88,4  | 20,0               |
| Summe    | 160            | 106                  | 66,3 | 171           | 162                  | 94,8  | 30,1               |

bei geimpften und unbehandelten Tieren zeigt, daß auch am Modell der intraperitonealen Infektion der Maus ein Impfschutz nach oraler spezifischer Immunisierung nachweisbar war, der durch den Kontakt mit vermehrungsfähigen Keimen in allen Versuchen besser war als durch Impfung mit Bakterien-Antigen. Um den Impferfolg deutlich zu machen, habe ich für die einzelnen Versuche und ihre Zusammenfassung die Wirkungsindizes nach der Formel

$$W = \frac{(b-a) \times 100}{b}$$

berechnet.

W = Wirkungsindex

a = Endmortalität der geimpften Tiere

b = Endmortalität der nichtgeimpften  
Kontrolltiere

Da die Mortalität bei den mit virulentem Impfstoff immunisierten Mäusen regelmäßig niedriger war als bei den mit hitzeabgetöteten Bakterien geimpften, liegen die Wirkungsindizes des Versuchs A alle höher als die der Gruppe B. Im Versuch Nr. 4, der bei den virulent geimpften Mäusen einen Wirkungsindex von 78,4 und bei den mit Antigen geimpften Tieren nur eine Wirksamkeit von 20,0 aufweist, kommt dieser Impferfolg besonders gut zum Ausdruck. Für diesen Einzelversuch ist der Impferfolg sogar statistisch gesichert. Die beobachtete Endmortalitätsdifferenz zwischen den beiden behandelten Tiergruppen Db beträgt 51,5 % und liegt damit nach KOLLER noch oberhalb der größtzulässigen Zufallsdifferenz Dz=43%. Da sich der Grad der statistischen Echtheit E aus Db:Dz berechnet, liegt dieser Wert mit 1,2 oberhalb der statistischen Signifikanz. In den übrigen Einzelversuchen sind die Differenzen zwischen den Endmortalitätszahlen zu gering, um statistische Sicherheit zu erlangen. Durch die spezifische orale Immunisierung mit vermehrungsfähigen S. schwarzengrund-Bakterien konnte die Mortalität bei den Versuchstieren im Vergleich zu einer nichtgeimpften Kontrollgruppe fast um

die Hälfte, und zwar von 94,8 % auf 48,2 % gesenkt werden, was einem Wirkungsindex von 49,2 entspricht. Dieses Ergebnis ist statistisch gesichert, da die beobachtete Differenz von 46,6 % die größte zulässige Zufallsdifferenz von 18 % um das 2,6-fache übertrifft. Der Impferfolg ist bei den mit inaktivierten Keimen geimpften Mäusen geringer. In der Zusammenfassung der einzelnen Versuche errechnet sich nur noch ein Wirkungsindex von 30,1, da die Sterblichkeit der immunisierten Tiere bei 66,3 % lag. Die Differenz in der Endmortalität zu den Kontrolltieren beträgt 28,5 % und ergibt, da Dz mit 15 % angegeben wird, noch einen statistischen Echtheitsgrad von 1,9.

In der Abb. 1 ist in Summenkurven der vier Einzelversuche der Verlauf der Sterblichkeit nach der Infektion mit der homologen Bakterienart bei den mit vermehrungsfähigen, mit hitzeinaktivierten und bei den ungeimpften Kontrolltieren graphisch dargestellt. Die drei Mortalitätskurven verlaufen während der ganzen Beobachtungszeit parallel zueinander, was einem ähnlichen akut-toxischen Infektionsverlauf sowohl bei geimpften als auch ungeimpften Mäusen entspricht. Der Impferfolg drückt sich in der unterschiedlichen Steilheit des Mortalitätsanstiegs an den ersten zwei Tagen nach der Infektion aus. Danach wurden nur noch vereinzelte Sterbefälle registriert. Dies wird noch anschaulicher in den Epidemiekurven der Abb. 2 dargestellt, in der die täglichen Sterbefälle nach der künstlich gesetzten Infektion verzeichnet sind. Während die Epidemie bei den Kontrolltieren schon am zweiten Tag nach der Infektion beendet ist, kommt es bei den immunisierten Tieren zu einem langsameren Abklingen offensichtlich als Ausdruck der bei einer kleinen Gruppe geimpfter Tiere verzögerten Überlebenszeit. Die mittleren Überlebenszeiten sind bei allen drei Tiergruppen entsprechend der schweren Intoxikation sehr kurz. Für die Kontrolltiere wurden sie mit 1,25 Tagen, für die mit inaktiviertem Bakterien-Antigen

# Orale Immunisierung mit S. schwarzengrund

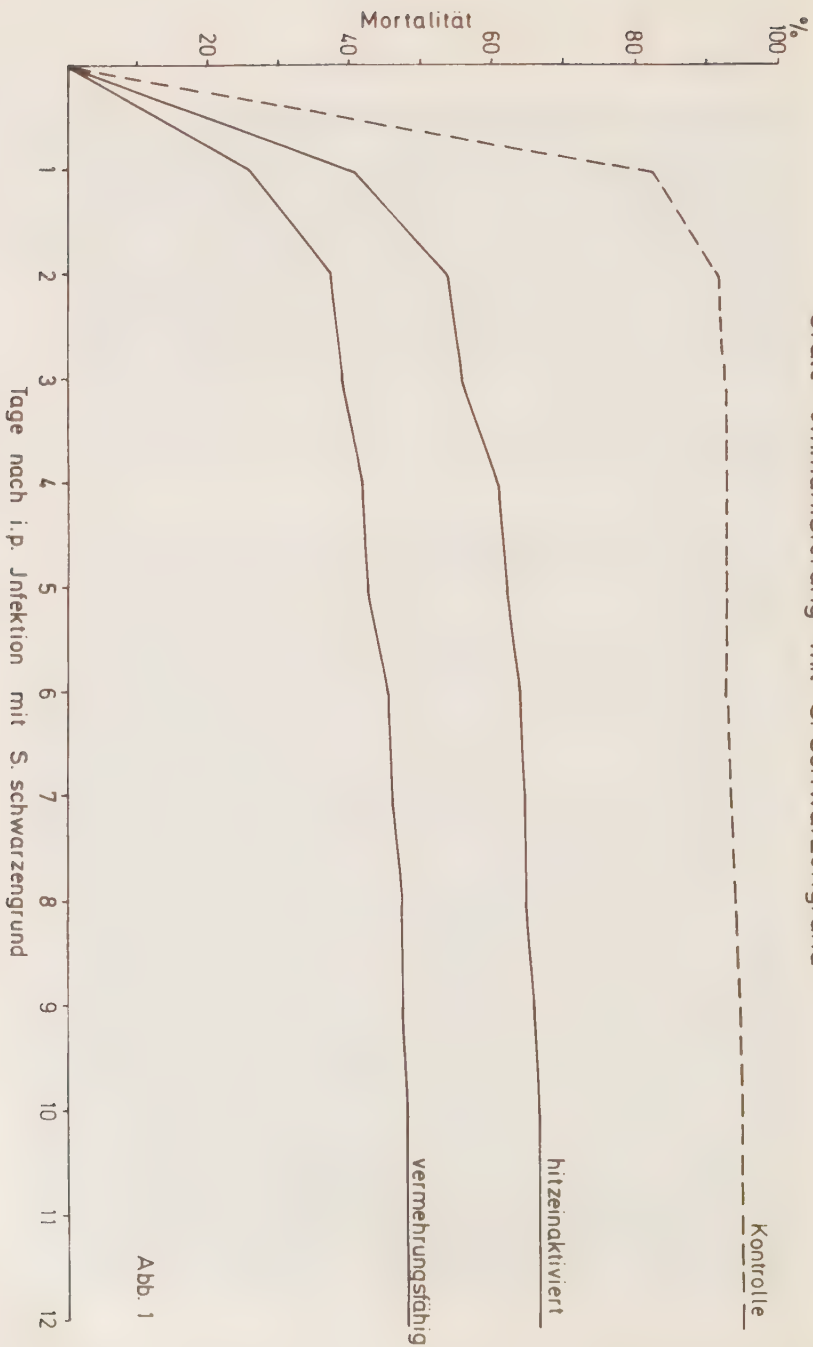


Abb. 1

# Orale Immunisierung mit S. schwarzengrund

- hitzeinaktiviert
- - - vermehrungsfähig
- - - Kontrolle

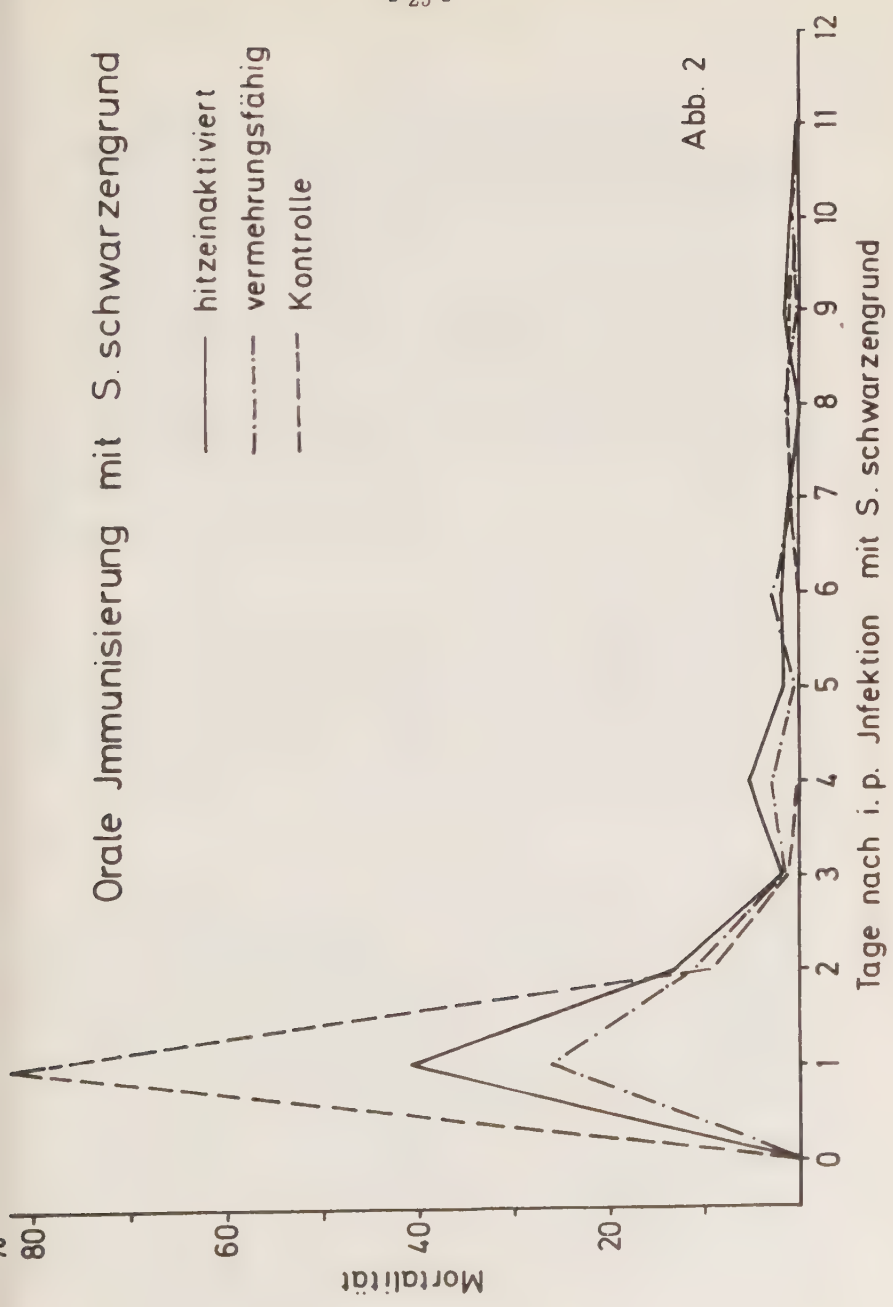


Abb. 2

geimpften Mäusen mit 1,99 Tagen und für die mit vermehrungsfähigen Keimen geimpften mit 2,25 Tagen berechnet.

Als Ergebnis für die spezifische orale Impfung mit *S. schwarzen-*grund-Bakterien wurde also bei beiden immunisierten Tiergruppen im Vergleich zu einer nichtgeimpften Kontrollgruppe eine erhebliche Senkung der Mortalität beobachtet. Der vermehrungsfähige Impfstoff führte zu einem deutlich besseren Impfschutz als der hitzeinaktivierte, da etwa die Hälfte der geimpften Tiere die Infektionsbelastung überlebte.

#### b. Gruppenspezifische Impfung

In dieser Versuchsgruppe mit insgesamt 485 Mäusen wurde nach der oralen Impfung mit *S. schwarzengrund* (Serotyp 1,4,12,27:d:1,7) mit der ebenfalls zur B-Gruppe gehörenden *S. heidelberg* (Serotyp 1,4,5,12:r:1,2) intraperitoneal belastet. Es sollte also in dieser Anordnung geprüft werden, ob die gemeinsamen O-Antigene 1, 4 und 12 einen übergreifenden Schutz verleihen.

Ein Vergleich zwischen den Endmortalitätswerten der Immun- und Kontrolltiere in der Tabelle 2 zeigt, daß bis auf einen einzelnen Versuch, in dem mit Bakterien-Antigen geimpft worden war, die Mortalität bei den immunisierten Tieren gegenüber dem hohen letalen Ausgang der Infektion bei den nichtgeimpften Kontrollmäusen gesenkt wurde. Obgleich diese Differenz sowohl in der Zusammenfassung als auch in den einzelnen Versuchen nur gering ist, läßt sich doch aus der Einheitlichkeit dieses Ergebnisses ein spürbarer Impferfolg ablesen.

Tabelle 2

Gruppenspezifische Impfung mit S. schwarzengrund

Die Zahlen der Immunisierungsversuche mit vermehrungsfähigen (Versuch A) und hitzeinaktivierten (Versuch B) S. schwarzengrund-Bakterien und gruppenspezifischer Infektionsbelastung mit S. heidelberg

A: Orale Impfung mit vermehrungsfähigen Bakterien

|           | Geimpfte Tiere |                           |      | Kontrolltiere |                           |       |                    |
|-----------|----------------|---------------------------|------|---------------|---------------------------|-------|--------------------|
| Vers. Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut in % |      | Anzahl        | gestorben<br>absolut in % |       | Wirkungs-<br>index |
| 1         | 50             | 45                        | 90,0 | 57            | 57                        | 100,0 | 10,0               |
| 2         | 38             | 27                        | 71,1 | 44            | 44                        | 100,0 | 28,9               |
| 3         | 29             | 27                        | 93,1 | 29            | 29                        | 100,0 | 6,9                |
| 4         | 27             | 24                        | 88,8 | 40            | 40                        | 100,0 | 11,2               |
| Summe     | 144            | 123                       | 85,4 | 170           | 170                       | 100,0 | 14,6               |

B: Orale Impfung mit hitzeinaktivierten Bakterien

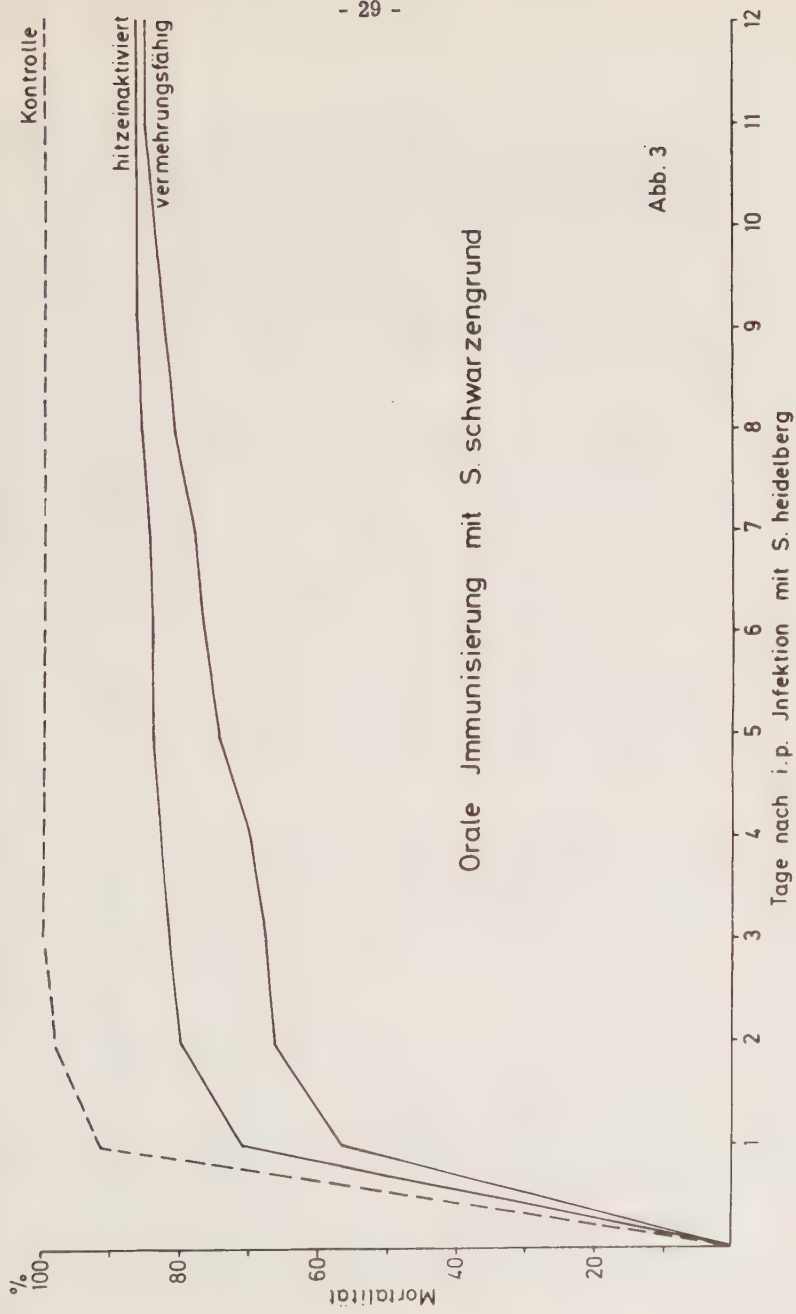
|           | Geimpfte Tiere |                           |       | Kontrolltiere |                           |       |                    |
|-----------|----------------|---------------------------|-------|---------------|---------------------------|-------|--------------------|
| Vers. Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut in % |       | Anzahl        | gestorben<br>absolut in % |       | Wirkungs-<br>index |
| 1         | 56             | 48                        | 85,7  | 57            | 57                        | 100,0 | 14,3               |
| 2         | 44             | 33                        | 75,0  | 44            | 44                        | 100,0 | 25,0               |
| 3         | 29             | 25                        | 86,2  | 29            | 29                        | 100,0 | 13,8               |
| 4         | 42             | 42                        | 100,0 | 40            | 40                        | 100,0 | 0,0                |
| Summe     | 171            | 148                       | 86,6  | 170           | 170                       | 100,0 | 13,4               |

Im Versuch Nr. 2 wurde der höchste Impfschutz dieser Versuchsanordnung mit Wirksamkeiten von 25,0 und 28,9 erreicht. Trotz der geringen Tierzahl ist der Impferfolg dieses Versuchs statistisch gesichert, da die beobachtete Differenz mit 25 % bei den mit Antigen geimpften Mäusen noch ein wenig über der größtzulässigen Zufallsdifferenz von 23,1 % liegt. Bei den mit vermehrungsfähigen Stämmen Geimpften beträgt Db 28,9 % und Dz 25,2 %. Die Echtheit der Differenzen liegt also bei 1,08 und 1,15.

Nur in den Versuchen 2 und 4 scheint der vermehrungsfähige Impfstoff wie in den oben beschriebenen Versuchen mit spezifischer Immunisierung einen besseren Impfschutz bewirkt zu haben als der hitzeinaktivierte. In der Zusammenfassung ergibt sich für den virulenten Impfstoff ein Wirkungsindex von 14,6 und für den hitzeinaktivierten ein etwas niedrigerer von 13,4. Die Mortalität wurde jeweils von 100 % bei den Kontrollen auf 85,4 % bzw. 86,6 % gesenkt. Dieser Impferfolg ist ebenfalls statistisch gesichert, da die beobachteten Endmortalitätsdifferenzen von 14,6 % und 13,4 % größer sind als die angegebenen größtzulässigen Zufallsdifferenzen von 11 % und 9,5 %. Die statistischen Echtheitsgrade errechnen sich somit mit 1,3 und 1,4.

Der Impferfolg läßt sich auch in dieser Versuchsgruppe an der mittleren Überlebenszeit der Mäuse ablesen. Während die Kontrolltiere durchschnittlich nach 1,12 Tagen sterben, verlängerte sich dieser Wert bei den mit S. schwarzengrund-Antigen geimpften Mäusen auf 1,42 Tage und bei den mit virulentem Impfstoff behandelten sogar auf 2,33 Tage.

Die Summenkurven der Abb. 3 zeigen den Infektionsverlauf bei den nach oraler gruppenspezifischer Impfung mit S. heidelberg infizierten Mäusen. Wenn auch bei den beiden behandelten Tiergruppen bei Versuchsabschluß am 12. Tag nach der Infektion die Mortalität an-



Orale Immunisierung mit S. schwarzengrund

Abb. 3

# Orale Immunisierung mit S. schwarzengrund

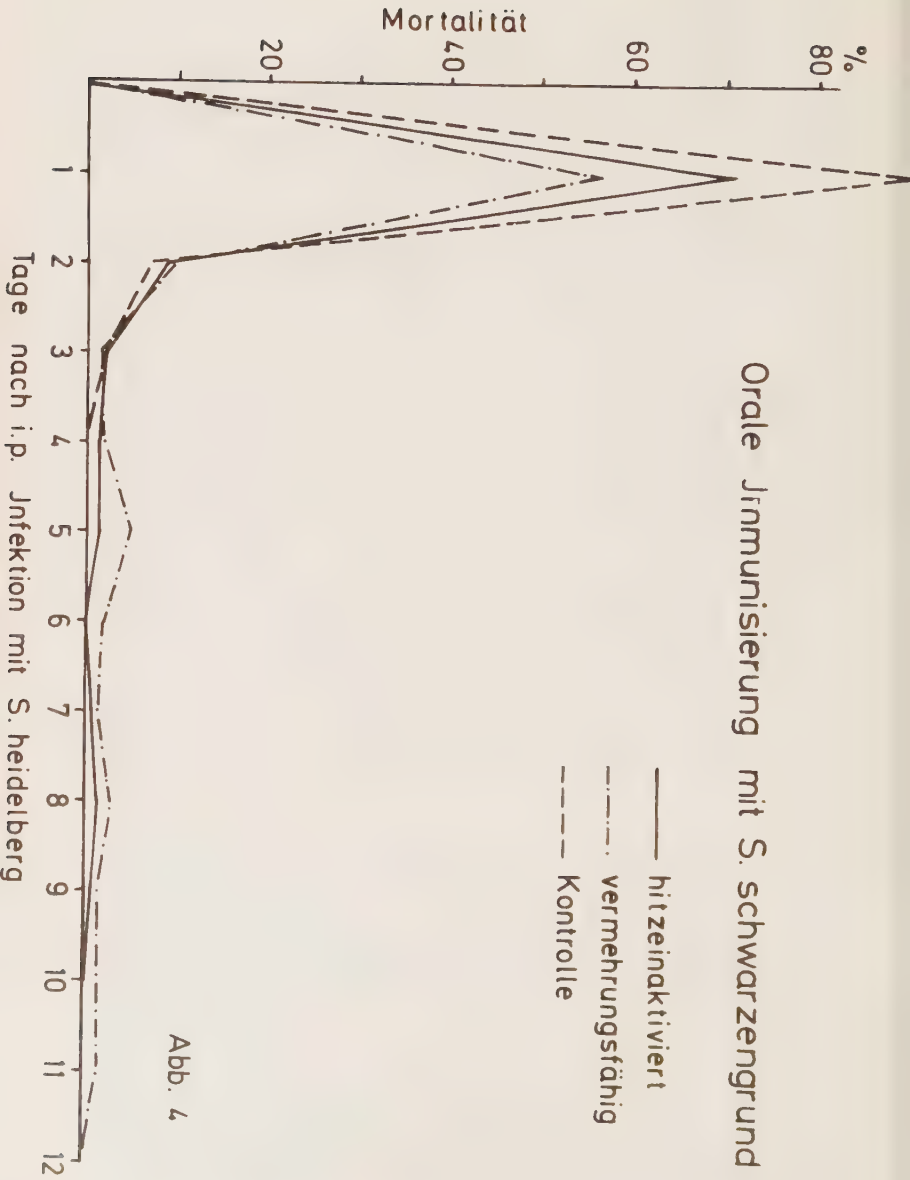


Abb. 4

nähernd gleich groß war, so zeigt sich dennoch während der Beobachtungszeit eine unterschiedliche Absterbeordnung. Auch nach gruppenspezifischer Impfung war bei den mit vermehrungsfähigen Salmonellen geimpften Tieren an den ersten Tagen nach der Infektion ein größerer Impfschutz vorhanden, der sich in dem Abstand der zueinander parallel verlaufenden Kurven der immunisierten Tiere ausdrückt. Nach Darstellung der Kurve läßt dieser Schutz nach dem 4. Tag immer mehr nach und gleicht sich bis zum 12. Tag der Beobachtungszeit der Kurve der mit Antigen geimpften Mäuse immer mehr an. In den Epidemiekurven der Abb. 4 kommt dieses offensichtliche Nachlassen des Impfschutzes noch differenzierter zum Ausdruck. Während die Epidemie bis zum 4. Tag nach der Infektion alle Kontrolltiere getötet hat, ist die Überlebenszeit bei einem Teil der geimpften Mäuse verlängert. Bei den mit vermehrungsfähigem Impfstoff immunisierten Tieren kommt es am 5. Tag nach der Infektion zu einem erneuten Anstieg der Sterbefälle, nach dem noch vereinzelt weitere Tiere bis zum Versuchsabschluß sterben.

Als Ergebnis der gruppenspezifischen Immunisierung mit *S. schwarzengrund*-Bakterien ließ sich bei etwa dem sechsten Teil der geimpften Mäuse anhand der Infektionsbelastung ein ausreichender Impfschutz feststellen.

### c. Gruppenunspezifische Impfung

In dieser Versuchsgruppe mit insgesamt 462 Mäusen wurde nach der oralen Impfung mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten *S. schwarzengrund*-Bakterien mit der heterologen, aus der Gruppe C/2 stammenden *S. newport* (Serotyp 6, 8:e, h: 1, 2) intraperitoneal infiziert. Diese Impfung war unspezifisch, da beide *Salmonella*-Arten keine gemeinsamen O-Antigene besitzen.

Tabelle 3

Gruppenunspezifische Impfung mit S. schwarzengrund

Die Zahlen der Immunisierungsversuche mit vermehrungsfähigen (Versuch A) und hitzeinaktivierten (Versuch B) S. schwarzengrund-Bakterien und gruppenunspezifischer Infektionsbelastung mit S. newport

A: Orale Impfung mit vermehrungsfähigen Bakterien

|           | Geimpfte Tiere |                      |      | Kontrolltiere |                      |      |                    |
|-----------|----------------|----------------------|------|---------------|----------------------|------|--------------------|
| Vers. Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in % | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in % | Wirkungs-<br>index |
| 1         | 44             | 28                   | 63,6 | 48            | 45                   | 93,7 | 32,1               |
| 2         | 41             | 35                   | 85,4 | 49            | 45                   | 91,8 | 7,0                |
| 3         | 27             | 24                   | 88,8 | 28            | 25                   | 89,3 | 1,1                |
| 4         | 24             | 20                   | 83,3 | 40            | 39                   | 97,5 | 14,6               |
| Summe     | 136            | 107                  | 78,8 | 165           | 154                  | 93,4 | 15,6               |

B: Orale Impfung mit hitzeinaktivierten Bakterien

|           | Geimpfte Tiere |                      |       | Kontrolltiere |                      |      |                    |
|-----------|----------------|----------------------|-------|---------------|----------------------|------|--------------------|
| Vers. Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in %  | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in % | Wirkungs-<br>index |
| 1         | 48             | 43                   | 89,6  | 48            | 45                   | 93,7 | 4,4                |
| 2         | 45             | 42                   | 93,3  | 49            | 45                   | 91,8 | 0,0                |
| 3         | 27             | 25                   | 92,6  | 28            | 25                   | 89,3 | 0,0                |
| 4         | 41             | 41                   | 100,0 | 40            | 39                   | 97,5 | 0,0                |
| Summe     | 161            | 151                  | 93,8  | 165           | 154                  | 93,4 | 0,0                |

In der Tabelle 3 sind die statistischen Zahlenangaben der vier Versuche und ihre Zusammenfassung enthalten. Ein Vergleich der Endmortalitäten und Wirkungsindizes zeigt, daß die mit hitzeinaktiviertem Bakterien-Antigen geimpften Tiere nicht geschützt waren, während die mit vermehrungsfähigem Impfstoff immunisierten Mäuse eine Wirksamkeit von 15,6 aufweisen, die somit noch etwas höher ist als nach gruppenspezifischer Infektionsbelastung mit *S. heidelberg*. Dieser Impferfolg, bei dem also die Mortalität von 93,4 % bei den Kontrolltieren auf 78,8 % bei den mit virulenten Keimen geimpften Tieren gesenkt werden konnte, ist statistisch gesichert. Die beobachtete Endmortalitätsdifferenz ist mit 14,6 % größer als die größtzulässige Zufallsdifferenz von 13,2 % und ergibt daher eine statistische Echtheit von 1,1. Auch für den Versuch Nr. 1, in dem der Impfschutz im Vergleich zu den übrigen Einzelversuchen bedeutend besser war, liegt das Ergebnis trotz der geringen Tierzahl innerhalb der statistischen Wahrscheinlichkeit. Da  $D_z = 27,8\%$  von der beobachteten Differenz von 30,1 % noch übertroffen wird, beträgt der Echtheitswert ebenfalls 1,1.

Die Werte für die mittlere Überlebenszeit der geimpften und nichtgeimpften Tiere von 3,86, 3,88 und 4,56 Tagen zeigen ebenfalls, daß die mit Bakterien-Antigen behandelten Mäuse nicht geschützt waren, während bei den mit virulenten Stämmen geimpften Tieren die mittlere Sterblichkeit verzögert war.

Abb. 5 zeigt in Summenkurven den Mortalitätsverlauf nach der unspezifischen Infektionsbelastung. Die Kurven steigen entsprechend dem für *S. newport* charakteristischen Infektionsverlauf langsam an und verlaufen in den letzten Tagen der Beobachtungszeit nahezu horizontal, da nur noch vereinzelt Mäuse sterben. Die Kurven der Kontrollmäuse und der mit inaktiviertem Impfstoff immunisierten Tiere verlaufen dicht beieinander. Auch die Epidemiekurven der

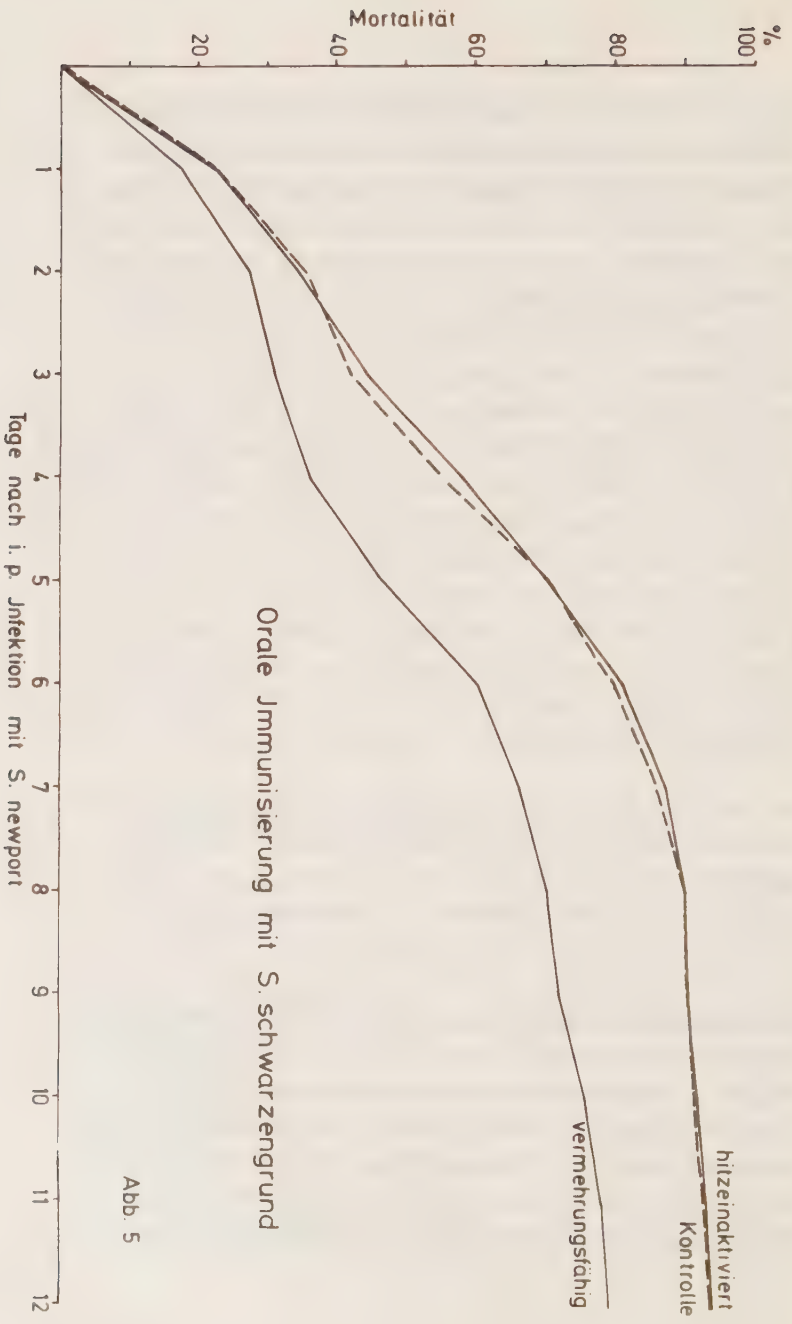


Abb. 5

# Orale Immunisierung mit S. schwarzengrund

- hitzeinaktiviert
- - - vermehrungsfähig
- - - Kontrolle

Mortalität

%

35

30

25

20

15

10

5

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

Tage nach i.p. Infektion mit S. newport

Abb. 6

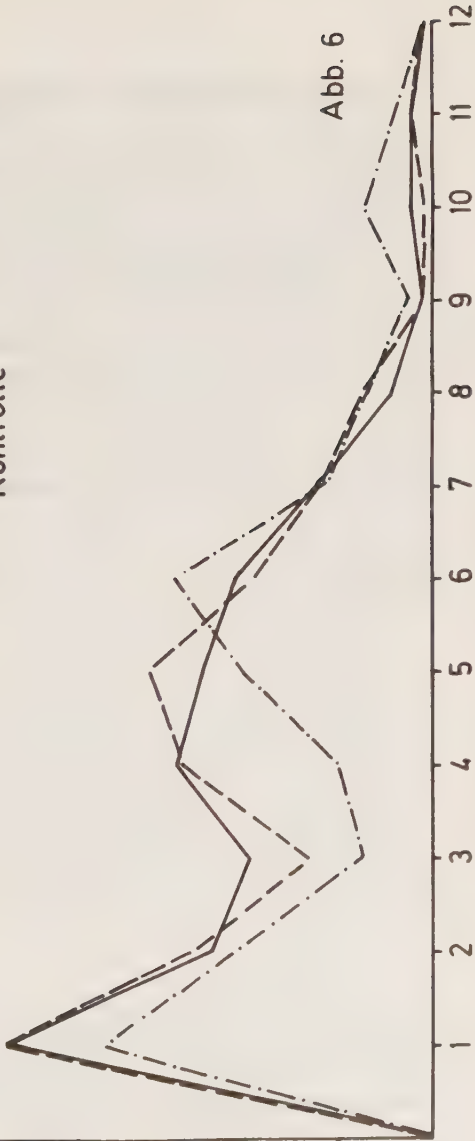


Abb. 6 zeigen, daß dieser Impfstoff in keiner Weise Schutz gegen eine unspezifische Infektion bot. Die drei Epidemiekurven zeigen gemeinsam einen zweimaligen Anstieg der Sterbefälle am 1. und 4. Tag nach der Infektion, wodurch zwei Epidemiegipfel zustandekommen. Der verzögerte Anstieg zum zweiten Epidemiegipfel bei den mit virulenten Keimen geimpften Mäusen scheint Ausdruck der verlängerten Überlebenszeit bei dieser Tiergruppe zu sein. In den Summenkurven wird dieser Impferfolg durch den Abstand zur nichtgeimpften Kontrollgruppe dargestellt.

Durch die orale Impfung mit vermehrungsfähigen *S. schwarzengrund*-Bakterien überlebte etwa ein Sechstel der geimpften Mäuse die Infektionsbelastung mit den heterologen *S. newport*-Bakterien. Die Impfung mit hitzeinaktiviertem Bakterien-Antigen hinterließ keinen nachweisbaren Schutz.

## 2. Orale Immunisierung mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten *S. newport*-Bakterien

Die Tierexperimente dieser Versuchsgruppe mit insgesamt 1529 Mäusen wurden in der gleichen dreiteiligen Versuchsanordnung wie die Immunisierungsversuche mit *S. schwarzengrund* durchgeführt. Zur oralen Impfung wurde ein vermehrungsfähiger und ein hitzeinaktivierter Impfstoff von *S. newport* (Serotyp 6, 8:e, h:1, 2) aus der Gruppe C/2, zur intraperitonealen Infektion virulente Stämme der homologen Spezies, der gruppenspezifischen *S. blockley* (Serotyp 6, 8:k:1, 5) und der gruppenunspezifischen, aus der B-Gruppe stammenden *S. schwarzengrund* (Serotyp 1, 4, 12, 27:d:1, 7) verwendet.

Die Differenzen zwischen den Endmortalitätswerten der einzelnen Tiergruppen dienten wieder als Maßstab der unspezifischen Wirkung der oral verabreichten Antigene. Wie in der ersten Versuchsgruppe sind die Ergebnisse in Tabellen (4-6) nach spezifischer, gruppenspezifischer und unspezifischer Immunisierung geordnet. In Summen- und Epidemiekurven (7-12) sind, getrennt nach Art des infizierenden Keimes, wieder die drei Versuchsansätze der mit vermehrungsfähigem und hitzeinaktiviertem Impfstoff behandelten und der nichtgeimpften Tiergruppen graphisch dargestellt.

### a. Spezifische Impfung

In dieser Versuchsgruppe mit 510 Mäusen wurde analog der spezifischen Impfung mit *S. schwarzengrund* nach erfolgter oraler Immunisierung mit den homologen Stämmen der *S. newport* intraperitoneal infiziert.

Bei einem Vergleich der Endmortalitätswerte und Wirkungsindizes der Tabelle 4 ist auffällig, daß in den beiden Versuchen 5 und 8

Tabelle 4

Spezifische Impfung mit S. newport

Die Zahlen der Immunisierungsversuche mit vermehrungsfähigen (Versuch A) und hitzeinaktivierten (Versuch B) S. newport-Bakterien und spezifischer Infektionsbelastung

A: Orale Impfung mit vermehrungsfähigen Bakterien

|           | Geimpfte Tiere |                      |      | Kontrolltiere |                      |       |                    |
|-----------|----------------|----------------------|------|---------------|----------------------|-------|--------------------|
| Vers. Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in % | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in %  | Wirkungs-<br>index |
| 5         | 39             | 13                   | 33,3 | 48            | 45                   | 93,8  | 64,5               |
| 6         | 31             | 28                   | 90,3 | 33            | 28                   | 84,8  | 0,0                |
| 7         | 45             | 38                   | 84,4 | 46            | 46                   | 100,0 | 15,6               |
| 8         | 48             | 19                   | 39,6 | 43            | 40                   | 93,0  | 57,4               |
| Summe     | 163            | 98                   | 60,1 | 170           | 159                  | 93,5  | 35,7               |

B: Orale Impfung mit hitzeinaktivierten Bakterien

|           | Geimpfte Tiere |                      |       | Kontrolltiere |                      |       |                    |
|-----------|----------------|----------------------|-------|---------------|----------------------|-------|--------------------|
| Vers. Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in %  | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in %  | Wirkungs-<br>index |
| 5         | 49             | 43                   | 87,7  | 48            | 45                   | 93,8  | 6,5                |
| 6         | 34             | 32                   | 94,0  | 33            | 28                   | 84,8  | 0,0                |
| 7         | 49             | 49                   | 100,0 | 46            | 46                   | 100,0 | 0,0                |
| 8         | 45             | 38                   | 84,4  | 43            | 40                   | 93,0  | 9,3                |
| Summe     | 177            | 162                  | 91,5  | 170           | 159                  | 93,5  | 2,1                |

ein zum Teil recht guter Impfschutz erzielt wurde, während bei den Tieren der beiden übrigen Versuche durch die spezifische Belastung kein Impfschutz nachweisbar war. Bei den mit inaktiviertem Bakterien-Antigen geimpften Tieren ergibt die Summation der Einzelversuche keine Senkung der Mortalität gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Es resultiert nur ein Wirkungsindex von 2,1, doch sind die Differenzen der Endmortalitätswerte zu den Kontrolltieren so gering, daß sie innerhalb der Streubreite liegen. Es konnte aber auch für diese Tiergruppe eine Schutzwirkung anhand der mittleren Überlebenszeit der Mäuse bewiesen werden. Während die Kontrolltiere durchschnittlich nach 4,24 Tagen starben, war bei den mit inaktivierten *S. newport*-Bakterien geimpften Mäusen die mittlere Überlebenszeit auf 4,96 Tage verlängert.

Noch stärker wird diese Zeitdifferenz in der mittleren Sterblichkeit zwischen geimpften und nichtgeimpften Tieren in den beiden Versuchen 6 und 7 augenscheinlich, bei denen der Wirkungsindex 0 ist. Für Versuch 6 liegen die entsprechenden Werte bei 3,57 Tagen und 4,19 Tagen und für Versuch 7 sogar bei 3,20 Tagen bei den unbehandelten und 4,16 Tagen bei den mit inaktivierten Bakterien geimpften Tieren. Da in diesen Einzelversuchen die mittlere Überlebenszeit der Kontrolltiere wesentlich kürzer war als im Gesamtdurchschnitt von 4,96 Tagen, so muß in diesen beiden Versuchen die Infektionsbelastung besonders schwer gewesen sein.

Bei den mit vermehrungsfähigen Salmonellen geimpften Mäusen konnte insgesamt etwa ein Drittel der immunisierten Tiere gegen die Infektion geschützt werden. Die Mortalität wurde gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe von 93,5 % auf 60,1 % gesenkt, was einem Wirkungsindex von 35,7 entspricht. Der Wert der statistischen Wahrscheinlichkeit beträgt für dieses Ergebnis 2,1,

da die beobachtete Differenz zu den Kontrolltieren mit 33,4 % etwa doppelt so groß ist wie  $Dz = 15,8 \%$ . Auch für die beiden Versuche 5 und 8 sind die Differenzen zwischen den Endmortalitätszahlen statistisch echt. Für Versuch 5 errechnet sich ein Echtheitsgrad von 1,72 ( $Db = 60,5 \%$ ,  $Dz = 35,2 \%$ ) und für Versuch 8 ein Wert von 1,70 ( $Db = 53,4 \%$  und  $Dz = 31,4 \%$ ).

Die Abbildung 7 stellt in Summenkurven und die Abbildung 8 in Epidemiekurven die täglichen Sterbefälle bei den drei verschiedenen Tiergruppen nach der künstlichen Infektion mit *S. newport* dar. Der Abstand der Summenkurven zwischen Kontrolltieren und mit inaktiviertem Impfstoff geimpften Mäusen zeigt deutlich die Verzögerung bei den geimpften Tieren. Am 6. Tag nach der Infektion kommt es zu einem erneuten Anstieg der Sterbefälle, der erheblich verspätet hinter dem zweiten Epidemiegipfel der Kontrolltiere folgt. Die Betrachtung der Summenkurven beider Immungruppen ergibt für die ersten Tage nach der Infektion einen ähnlichen Verlauf. Nach dem 6. Tag der Beobachtungszeit entfernen sie sich zunehmend voneinander, da nun, wie die Epidemiekurven zeigen, bei den virulent geimpften Tieren nur noch vereinzelt Tiere starben. Der Impferfolg durch den vermehrungsfähigen Impfstoff ist aus dem Abstand der Summenkurve zum Verlauf der Kontrollkurve ersichtlich.

Durch die spezifische Immunisierung mit *S. newport* konnte durch Infektionsbelastung bei einem Drittel der mit vermehrungsfähigen Keimen geimpften Mäuse ein wirksamer Impfschutz festgestellt werden. Nach oraler Verimpfung von inaktiviertem Bakterien-Antigen war eine Schutzwirkung nur an der Verlängerung der mittleren Überlebenszeit bei den immunisierten Tieren nachweisbar.

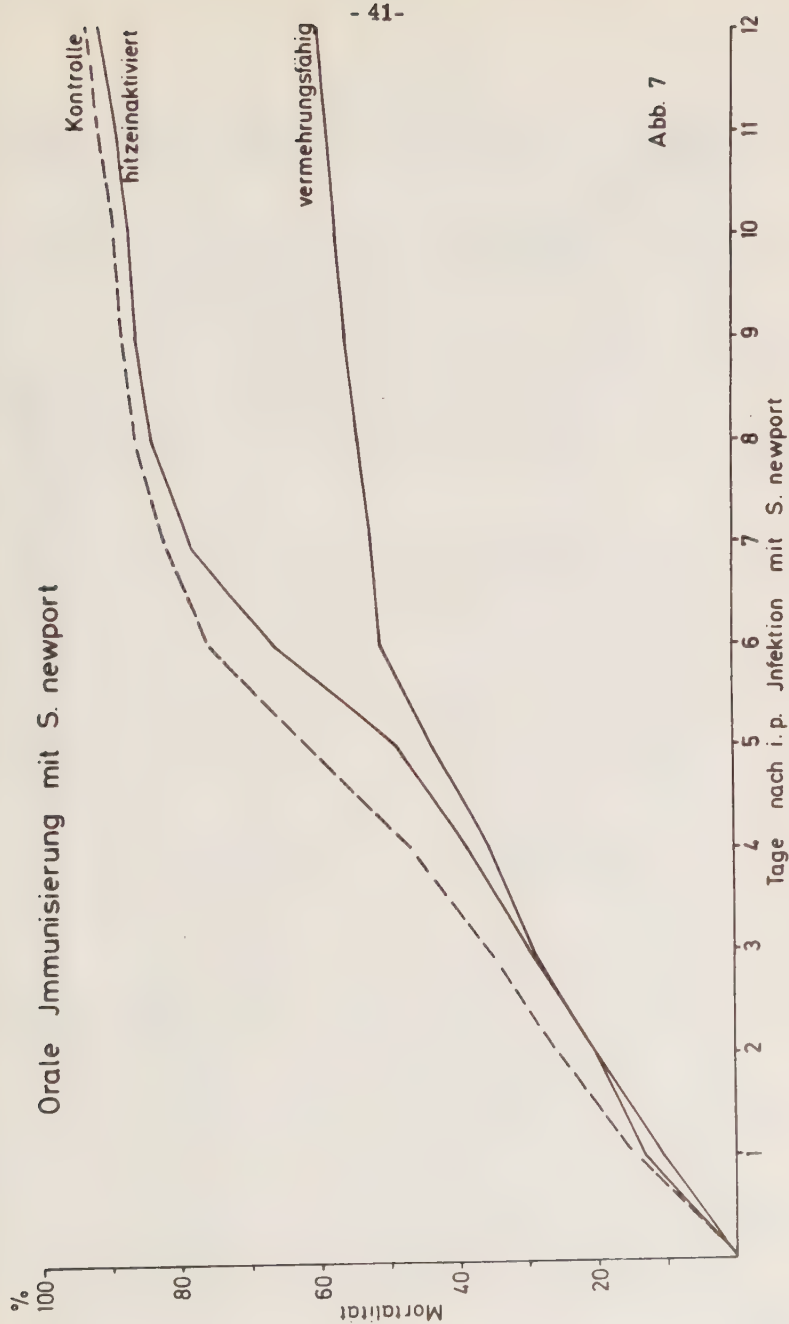


Abb. 7

## Orale Immunisierung mit *S. newport*

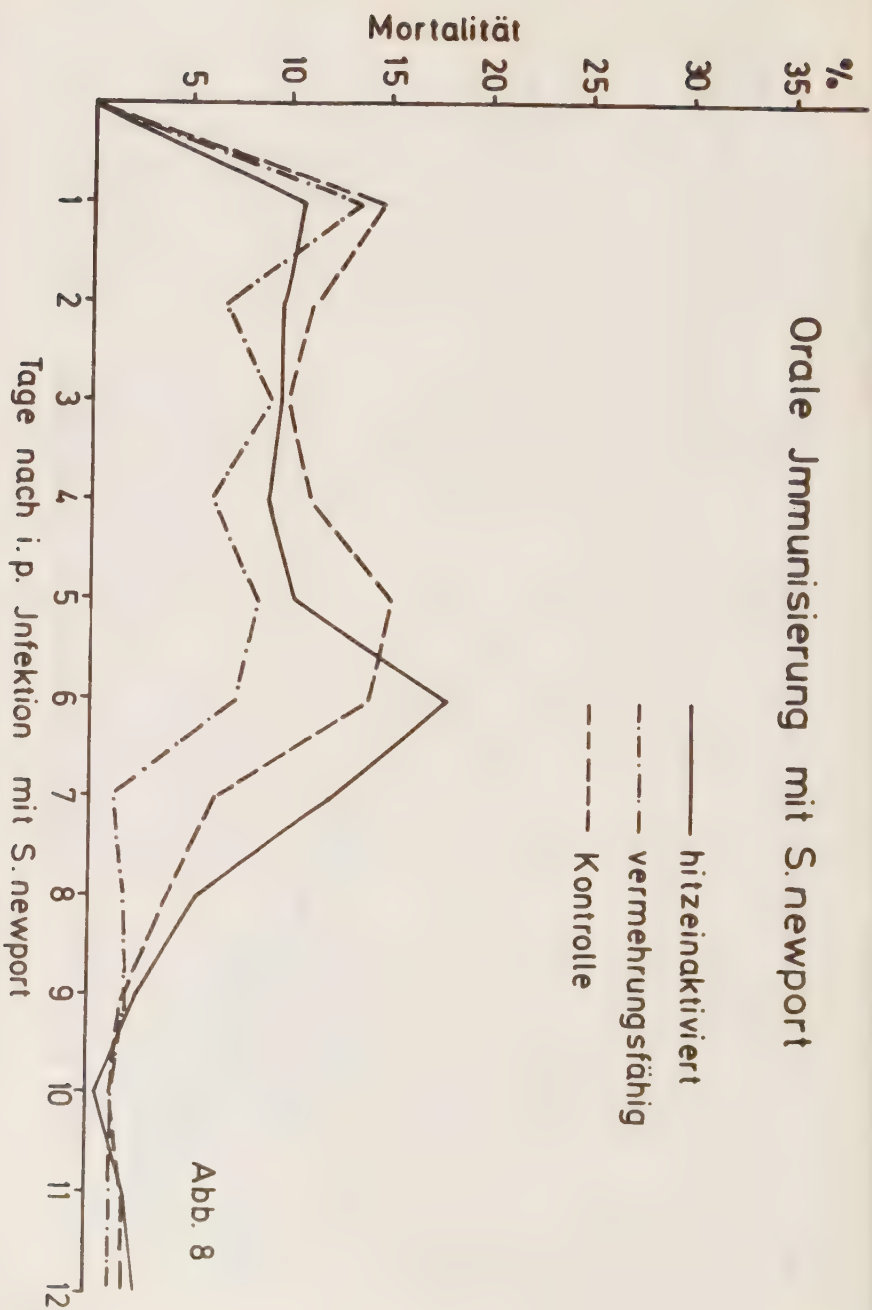


Abb. 8

## b. Gruppenspezifische Impfung

In der Tabelle 5 sind die statistischen Zahlen der Versuche mit gruppenspezifischer Belastung durch *S. blockley* enthalten, an denen insgesamt 506 Mäuse beteiligt waren. Nach der oralen Impfung mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten Keimen der *S. newport* (Serotyp 6, 8:e, h:1, 2) wurden die Tiere mit der ebenfalls zur C/2 Gruppe gehörenden *S. blockley* (Serotyp 6, 8:k:1, 5) infiziert und die Schutzwirkung der gemeinsamen O-Antigene 6 und 8 auf ihre Erregerspezifität geprüft.

In der Zusammenfassung der Einzelversuche ist auch bei gruppenspezifischer Impfung mit hitzeinaktivierten *S. newport*-Bakterien nur ein geringgradiger Impfschutz vorhanden. Die Mortalität wurde von 86,0 % bei den Kontrolltieren auf 79,8 % bei den mit Antigen Geimpften gesenkt, was einem Wirkungsindex von nur 7,2 entspricht. Die beobachtete Differenz von 6,2 % ist für eine statistische Sicherung zu klein. Allein der Versuch Nr. 7 mit einem Wirkungsindex von 32,1 zeigt einen guten Impfschutz, der sich in einer Mortalitätsdifferenz zu den Kontrolltieren von 31,1 % ausdrückt. Da die größtzulässige Zufallsdifferenz für dieses Ergebnis 25,2 % beträgt, besitzt es einen statistischen Echtheitsgrad von 1,23.

Der vermehrungsfähige Impfstoff war auch in dieser Versuchsgruppe bis auf den eben beschriebenen Versuch Nr. 7 wirksamer als der hitzeinaktivierte. Ein außerordentlich guter Impfschutz wurde in Versuch Nr. 8 erreicht, da die Mortalität durch die Impfung gegenüber den Kontrollen um etwa 75 % gesenkt werden konnte. Der Wert der statistischen Echtheit beträgt für dieses Ergebnis 1,8, da  $Db = 57\%$  noch erheblich größer ist als die größtzulässige Zufallsdifferenz von 31,9%. Für die Zusammenfassung der Einzelversuche beträgt die Mortalitätsdifferenz zur Kontrollgruppe 28,9 %, woraus wieder ein statistischer Echtheitsgrad von

Tabelle 5

Gruppenspezifische Impfung mit S.newport

Die Zahlen der Immunisierungsversuche mit vermehrungsfähigen (Versuch A) und hitzeinaktivierten (Versuch B) S.newport-Bakterien und gruppenspezifischer Infektionsbelastung mit S. blockley

A: Orale Impfung mit vermehrungsfähigen Bakterien

|          | Geimpfte Tiere |                      |      | Kontrolltiere |                      |      |                    |
|----------|----------------|----------------------|------|---------------|----------------------|------|--------------------|
| Vers.Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in % | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in % | Wirkungs-<br>index |
| 5        | 40             | 24                   | 60,0 | 50            | 39                   | 78,0 | 23,1               |
| 6        | 33             | 24                   | 72,7 | 34            | 33                   | 97,0 | 25,0               |
| 7        | 45             | 36                   | 80,0 | 43            | 42                   | 97,7 | 18,1               |
| 8        | 43             | 8                    | 18,6 | 45            | 34                   | 75,6 | 75,7               |
| Summe    | 161            | 92                   | 57,1 | 172           | 148                  | 86,0 | 33,6               |

B: Orale Impfung mit hitzeinaktivierten Bakterien

|          | Geimpfte Tiere |                      |      | Kontrolltiere |                      |      |                    |
|----------|----------------|----------------------|------|---------------|----------------------|------|--------------------|
| Vers.Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in % | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in % | Wirkungs-<br>index |
| 5        | 48             | 42                   | 87,5 | 50            | 39                   | 78,0 | 0,0                |
| 6        | 33             | 32                   | 97,0 | 34            | 33                   | 97,0 | 0,0                |
| 7        | 50             | 33                   | 66,0 | 43            | 42                   | 97,7 | 32,5               |
| 8        | 42             | 31                   | 73,8 | 45            | 34                   | 75,6 | 2,4                |
| Summe    | 173            | 138                  | 79,8 | 172           | 148                  | 86,0 | 7,2                |

1,8 resultiert, da Dz mit 16,1 % angegeben wird. Insgesamt wurde bei den mit vermehrungsfähigen Keimen geimpften Tieren eine Senkung der Sterblichkeit um 33 % erreicht, was einer Wirksamkeit von 33,6 entspricht.

Die Auswertung der mittleren Überlebenszeiten ergibt, daß die Kontrolltiere durchschnittlich nach 4,19 Tagen starben, die mit inaktivierten Bakterien geimpften nach 4,75 Tagen, während die mittlere Sterblichkeit bei den mit virulenten Keimen geimpften Tieren bis auf 5,0 Tage verlängert war.

In der Abbildung 9 wird der Verlauf der Mortalität bei den drei verschiedenen Tiergruppen nach der Infektion mit *S. blockley* in Summenkurven graphisch dargestellt. Die Aufzeichnung bietet ein ähnliches Bild wie bei der spezifischen Infektionsbelastung (Abb. 7). In den ersten Tagen nach der Infektion kommt es wieder zur Überschneidung der Kurven der beiden Immungruppen, da die Sterbeziffer bei den virulent Geimpften höher ist als bei der mit Antigen behandelten Gruppe. Während dann die Kurve der mit inaktivierten Bakterien geimpften Mäuse, die an den ersten Tagen nach der Infektion erheblich hinter der Kontrollkurve verzögert war, sich deren Verlauf annähert, drückt sich nun der erheblich stärkere Impfschutz bei den mit virulenten Keimen geimpften Tieren in der größer werdenden Entfernung der Kurven zueinander aus. Die Epidemiekurve der Abbildung 10 zeigt für die virulent geimpften Mäuse nach dem ersten Epidemiegipfel außer geringen Schwankungen einen gleichförmigen Epidemieverlauf. Bei den mit inaktivierten Bakterien immunisierten Tieren kommt es während der Beobachtungszeit nach einer deutlichen Schutzwirkung in den ersten drei Tagen zu einem erneuten Ansteigen der Sterbeziffern vom 4. bis 6. Tag offensichtlich als Ausdruck einer verzögerten Überlebenszeit bei einer geringen Anzahl der behandelten Mäuse.

# Orale Immunisierung mit S. newport

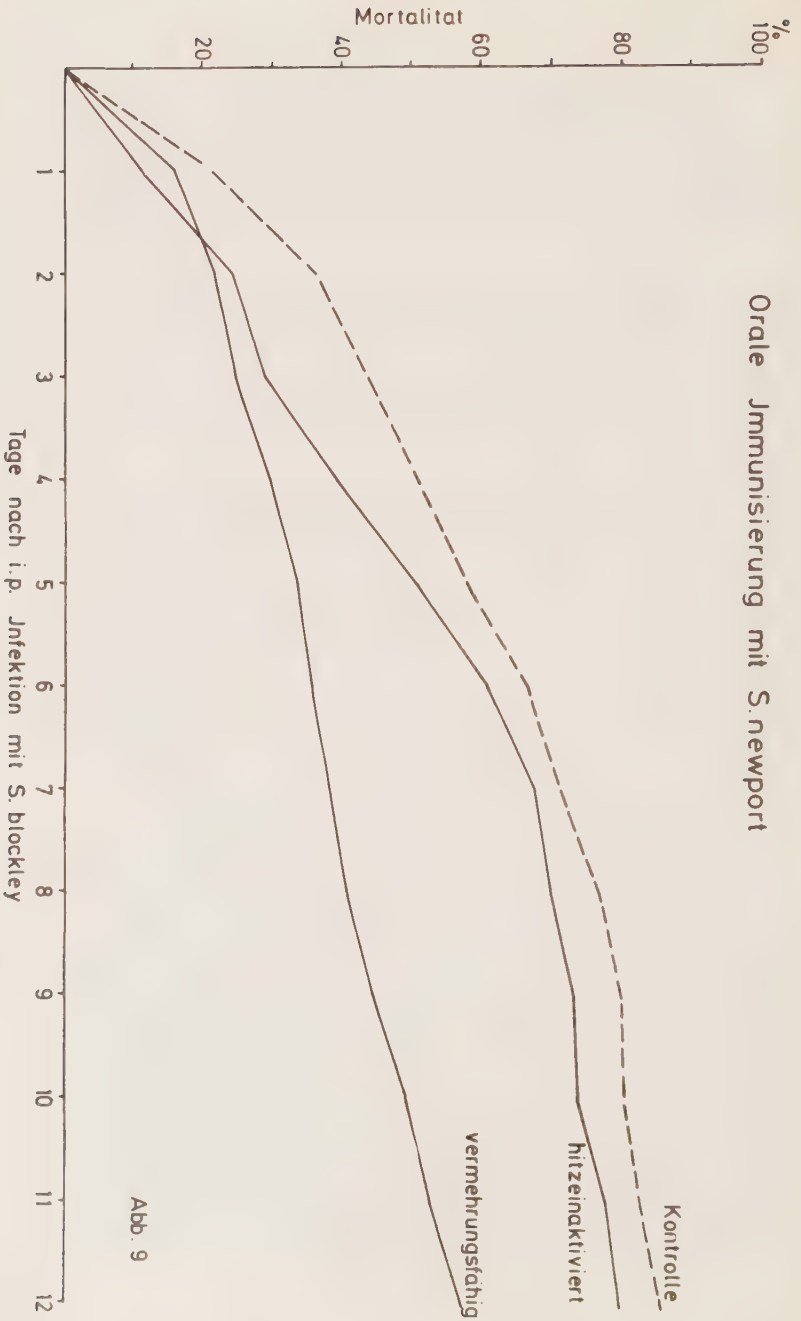


Abb. 9

# Orale Immunisierung mit *S. newport*

- hitzeinaktiviert
- · - · - vermehrungsfähig
- - - - - Kontrolle

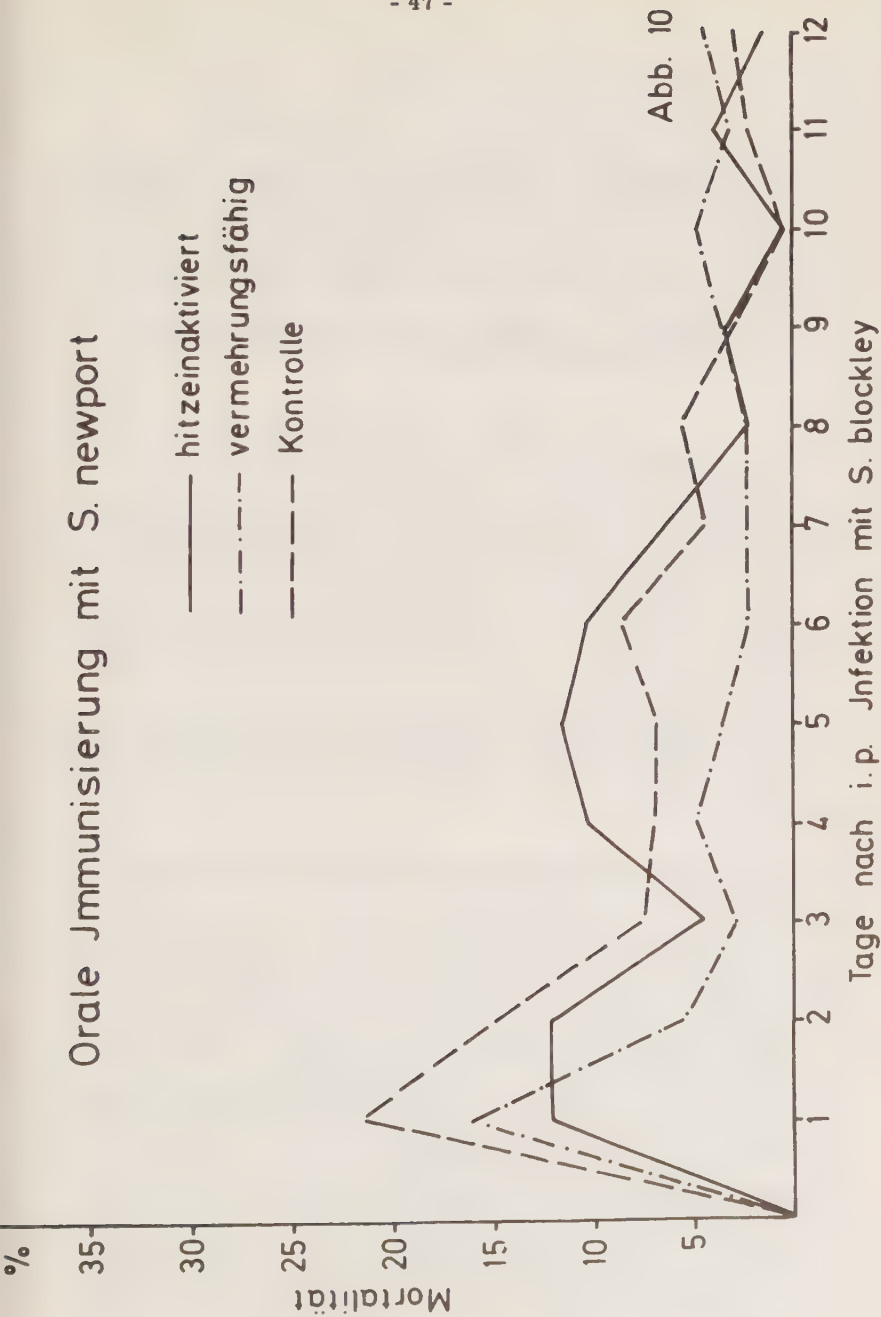


Abb. 10

Durch gruppenspezifische Immunisierung mit vermehrungsfähigen *S.newport*-Bakterien wurde ein der spezifischen Impfung gleichwertiger Impfschutz erreicht, da ebenfalls ein Drittel der Tiere die intraperitoneale Infektion mit virulenten Stämmen überlebte. Die mit inaktiviertem Bakterien-Antigen geimpften Mäuse waren nur zu einem geringen Teil geschützt.

### c. Gruppenunspezifische Impfung

Die Tabelle 6 enthält die statistischen Zahlenangaben der 4 Einzelversuche mit insgesamt 513 Mäusen für die gruppenunspezifische Infektionsbelastung mit *S. schwarzengrund* aus der Gruppe B nach erfolgter Impfung mit *S.newport*. Beide *Salmonella*-Arten besitzen keine gemeinsamen Körperantigene.

Für den hitzeinaktivierten Impfstoff beträgt der Wirkungsindex in der Zusammenfassung 0, da auch in allen Einzelergebnissen kein Impfschutz erkennbar war.

Durch Impfung mit vermehrungsfähigen Keimen konnte in den beiden Versuchen 6 und 8 ein Impfschutz erreicht werden, der sich in den beiden Wirkungsindizes von 29,2 und 12,2 ausdrückt. Insgesamt wurde daher die Mortalität in dieser Tiergruppe von 98,3 % bei den Kontrolltieren auf 90,0 % bei den geimpften Mäusen gesenkt, was einem Wirkungsindex von 8,4 entspricht. Dieser also bei einer kleinen Anzahl von immunisierten Mäusen vorhandene Impfschutz wird durch den Abstand der Summenkurven der Mortalitätswerte zueinander in der Abbildung 11 dargestellt. Die Epidemiekurven der Abbildung 12 zeigen für alle drei Tiergruppen den gleichen Verlauf, nur liegen die Sterbeziffern bei den mit virulenten Keimen Geimpften etwas niedriger. Die mittlere Sterblichkeit war bei allen Tiergruppen von gleich kurzer Dauer.

Tabelle 6

Gruppenunspezifische Impfung mit S. newport

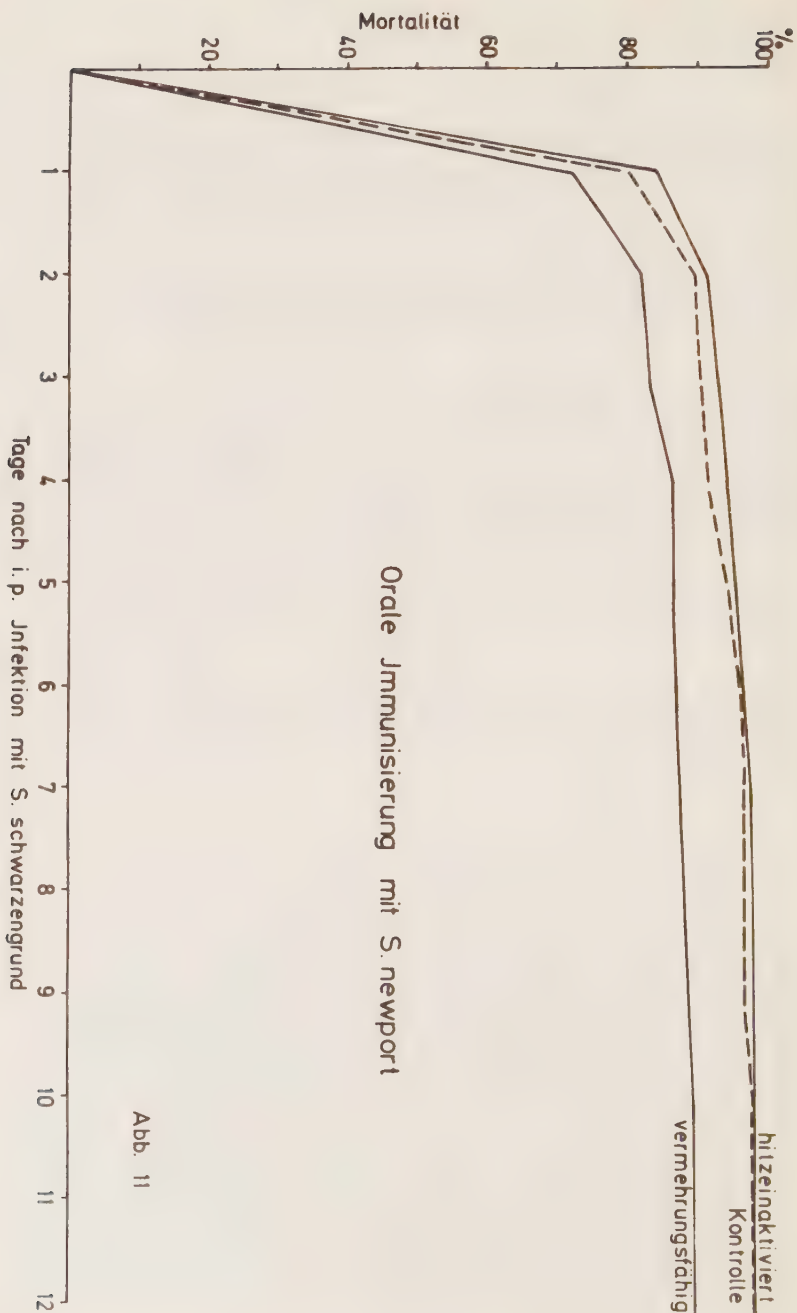
Die Zahlen der Immunisierungsversuche mit vermehrungsfähigen (Versuch A) und hitzeinaktivierten (Versuch B) S. newport-Bakterien und gruppenunspezifischer Infektionsbelastung mit S. schwarzengrund

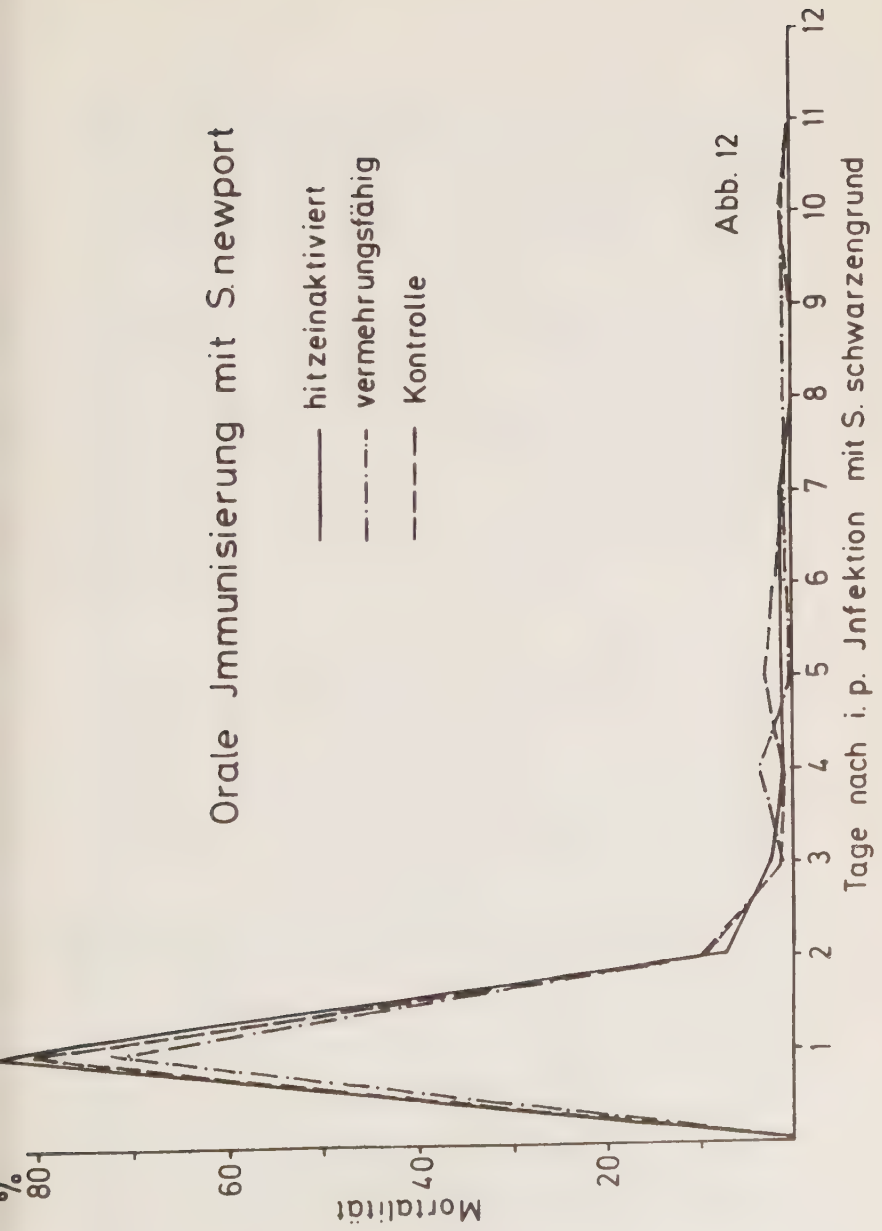
A: Orale Impfung mit vermehrungsfähigen Bakterien

|           | Geimpfte Tiere |                      |       | Kontrolltiere |                      |       |                    |
|-----------|----------------|----------------------|-------|---------------|----------------------|-------|--------------------|
| Vers. Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in %  | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in %  | Wirkungs-<br>index |
| 5         | 43             | 42                   | 97,7  | 49            | 48                   | 98,0  | 0,5                |
| 6         | 32             | 22                   | 68,8  | 35            | 34                   | 97,1  | 29,2               |
| 7         | 46             | 46                   | 100,0 | 47            | 46                   | 97,9  | 0,0                |
| 8         | 49             | 43                   | 87,8  | 46            | 46                   | 100,0 | 12,2               |
| Summe     | 170            | 153                  | 90,0  | 177           | 174                  | 98,3  | 8,4                |

B: Orale Impfung mit hitzeinaktivierten Bakterien

|           | Geimpfte Tiere |                      |       | Kontrolltiere |                      |       |                    |
|-----------|----------------|----------------------|-------|---------------|----------------------|-------|--------------------|
| Vers. Nr. | Anzahl         | gestorben<br>absolut | in %  | Anzahl        | gestorben<br>absolut | in %  | Wirkungs-<br>index |
| 5         | 46             | 44                   | 95,6  | 49            | 48                   | 98,0  | 2,4                |
| 6         | 32             | 31                   | 96,9  | 35            | 34                   | 97,1  | 0,8                |
| 7         | 48             | 48                   | 100,0 | 47            | 46                   | 97,9  | 0,0                |
| 8         | 40             | 40                   | 100,0 | 46            | 46                   | 100,0 | 0,0                |
| Summe     | 166            | 163                  | 98,2  | 177           | 174                  | 98,3  | 0,0                |





Durch die unspezifische Impfung mit hitzeinaktivierten *S. newport*-Bakterien wurde kein durch eine Infektion mit *S. schwarzengrund* belastbarer Schutz festgestellt, doch war nach Impfung mit vermehrungsfähigen Keimen eine geringgradige Schutzwirkung vorhanden.

#### IV. Diskussion

##### 1. Die Immunitätsreaktion nach der oralen Impfung

Der Immunmechanismus der oralen Immunisierung gegen eine Enteritis-Infektion ist auch heute noch weitgehend unbekannt. Seit den ersten Versuchen zur oralen Impfung war man bemüht, diese Art der erworbenen Immunität aufzuklären. Während BESREDKA (4) glaubte, durch die orale Immunisierung eine lokale Immunität des Darmes zu erzeugen, sieht man heute den erworbenen Schutz in einer allgemeinen Immunität des Organismus. Dieser Impfschutz scheint sich aber von dem durch parenterale Impfung erzielten zu unterscheiden.

In der von mir gewählten Versuchsanordnung am Modell der unphysiologischen intraperitonealen Infektionsbelastung der Maus nach oraler Verimpfung von hitzeinaktivierten oder vermehrungsfähigen Salmonellen, konnte ich einen weiteren Beweis dafür liefern, daß der Impfschutz nicht nur lokal auf die Darmschleimhaut beschränkt ist, sondern daß nach oraler Immunisierung eine allgemeine Immunitätsreaktion stattfindet. Ein lokaler Impfschutz hätte die Versuchstiere nur gegen eine orale, dem natürlichen Infektionsmodus entsprechende Belastung geschützt. Es ist also nicht allein zu einem Kontakt des Darmepithels mit dem Antigen gekommen, sondern zu einer Resorption der Bakterien-Antigene, die die immunkompetenten Zellen des RES zur Antikörperbildung stimuliert haben. Für eine allgemeine Immunitätsreaktion des oral geimpften Organismus könnte außerdem sprechen, daß der geprüfte Impfschutz weitgehend spezifisch, also von den O-Antigenen bestimmt war, wofür ein Kontakt des Impfstoffs mit den Zellen des antikörperbildenden Systems vorausgesetzt werden muß.

## 2. Erörterung der Versuchsergebnisse hinsichtlich Spezifität und unspezifischer Leistung der oralen Immunisierung

Um einen Vergleich der Leistung der oralen Impfung in Abhängigkeit von der Spezifität des infizierenden Keimes zu zeigen, habe ich die Summationsergebnisse beider Versuchsgruppen aus den Tabellen 1 bis 6, geordnet nach Impfstoff-Antigen und Infektionsart, in der Tabelle 7 zusammengefaßt. Dadurch wurden die Versuche, in denen *S. schwarzengrund* und *S. newport* zur Impfung bzw. zur Infektionsbelastung verwandt wurden, als Kreuzversuch dargestellt, obgleich sie nicht zur gleichen Zeit durchgeführt wurden. Es wird also die Frage der Kreuzimmunität zu diskutieren sein. Der Impferfolg ergibt sich wieder aus dem Vergleich der Endmortalitätswerte der geimpften und nichtgeimpften Tiere. In Spalte 9 ist er als Wirksamkeit berechnet. Um auch die Leistung der oralen Impfung gegenüber der nichterregerspezifischen Infektionsbelastung bewerten zu können, habe ich in Spalte 10 den Leistungsindex berechnet, wobei die Wirksamkeit der spezifischen Impfung gleich 100 gesetzt wurde. Je kleiner die Ziffer des Leistungsindex ist, desto größer ist also der Leistungsabfall zur spezifischen Immunisierung.

Wie ich bei der Besprechung der Versuchsergebnisse bereits ausgeführt habe, ist durch Impfung mit vermehrungsfähigen Salmonellen eine stärkere Schutzwirkung erreicht worden als mit hitzeinaktiviertem Impfstoff. Dieses Ergebnis verweist auf das Problem der Impfstoffherstellung. Die durch thermische Einwirkung inaktivierten Bakterien scheinen ein geringeres Spektrum ihrer antigenen Struktur besessen zu haben als die virulenten Keime, da sie weniger wirksam waren. Der antigene Aufbau der vermehrungsfähigen Bakterien ist vermutlich breiter und daher von intensiverer immunisatorischer Wirkung. Hinzu kommt, daß die hitzeabgetöteten Bak-

Tabelle 7

Zusammenfassung der beiden Versuchsgruppen mit oraler Immunisierung von Mäusen durch virulente und inaktivierte S. schwarzenrund-Bakterien und S. newport-Bakterien für einen Vergleich der Leistung der oralen Impfung bei stamm-, gruppen- spezifischer und gruppen- unspezifischer Infektionsbelastung

| Orale Immunisierung                                  | Intraperitoneale Salmonella-Spezies | Infektion Art       | Versuch       |                    | Kontrolle     |                    | Stat. Signifikanz E | Wirksamkeit | Leistungsindex |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|---------------------|-------------|----------------|
|                                                      |                                     |                     | Zahl d. Tiere | Endmortalität in % | Zahl d. Tiere | Endmortalität in % |                     |             |                |
| 1                                                    | 2                                   | 3                   | 4             | 5                  | 6             | 7                  | 8                   | 9           | 10             |
| <u>S.</u><br>schwarzenrund-<br>vermehrungs-<br>fähig | S. schwarzenrund.                   | stammspez.          | 141           | 48,2               | 171           | 94,8               | 2,6                 | 49,2        | 100            |
|                                                      | S. heidelberg                       | gruppen-<br>spez.   | 144           | 85,4               | 170           | 100,0              | 1,4                 | 14,6        | 30             |
|                                                      | S. newport                          | gruppen-<br>unspez. | 136           | 78,8               | 165           | 93,4               | 1,1                 | 15,6        | 32             |
| <u>S.</u><br>schwarzenrund-<br>hitzeinaktiviert      | S. schwarzenrund.                   | stammspez.          | 160           | 66,3               | 171           | 94,8               | 1,9                 | 30,1        | 100            |
|                                                      | S. heidelberg                       | gruppen-<br>spez.   | 171           | 86,6               | 170           | 100,0              | 1,3                 | 13,4        | 44             |
|                                                      | S. newport                          | gruppen-<br>unspez. | 161           | 93,8               | 165           | 93,4               | <1                  | 0,0         | 0              |
| <u>S.</u><br>newport<br>vermehrungs-<br>fähig        | S. newport                          | stammspez.          | 163           | 60,1               | 170           | 93,5               | 2,1                 | 35,7        | 100            |
|                                                      | S. blockley                         | gruppen-<br>spez.   | 161           | 57,1               | 172           | 86,0               | 1,8                 | 33,6        | 94             |
|                                                      | S. schwarzenrund.                   | gruppen-<br>unspez. | 170           | 90,0               | 177           | 98,3               | <1                  | 8,4         | 24             |
| <u>S.</u><br>newport<br>hitzeinaktiviert             | S. newport                          | stammspez.          | 177           | 91,5               | 170           | 93,5               | <1                  | 2,1         | ---            |
|                                                      | S. blockley                         | gruppen-<br>spez.   | 173           | 79,8               | 172           | 86,0               | <1                  | 7,2         | ---            |
|                                                      | S. schwarzenrund.                   | gruppen-<br>unspez. | 166           | 98,2               | 177           | 98,3               | <1                  | 0,0         | ---            |

terien bewegungsunfähig sind und durch passive Resorption in den Kreislauf gelangen, während die lebenden Bakterien zusätzlich zur aktiven Penetration befähigt sind und so wahrscheinlich zu einem umfassenderen Kontakt mit den Zellen der RES gekommen sind. Ferner spielt sicher eine verstärkte Aktivität der unspezifischen Abwehrkräfte des Organismus eine Rolle, die durch die virulenten Bakterien einen stärkeren Reiz erfahren als durch die hitzeinaktivierten Keime.

Für die spezifische orale Impfung mit *S. schwarzengrund* zeigt ein Vergleich der Wirkungsindizes der Tabelle 7 für den vermehrungsfähigen Impfstoff eine Wirksamkeit von 49,2 und für den abgetöteten Impfstoff eine Wirksamkeit von 30,1 an. Bei der *S. newport*-Impfung fällt der Wirkungsindex von 35,7 beim vermehrungsfähigen Impfstoff auf 2,1 bei der Impfung mit *S. newport*-Antigen ab. Es war also durch homologe Infektionsbelastung nach Verimpfung von virulenten Keimen ein hochwertiger, nach Impfung mit inaktivierten Bakterien ein erheblich geringerer Impfschutz nachweisbar.

Die Versuchsergebnisse von KINNE-SAFFRAN zur spezifischen oralen Immunisierung zeigen für die Zusammenfassung von drei Einzelversuchen mit hitzeinaktivierten *S. schwarzengrund*-Bakterien einen Wirkungsindex von 48,4, der somit fast ebenso groß ist wie die in meinen Tierversuchen erlangte Wirksamkeit des virulenten Impfstoffs (39). Für einen Einzelversuch, in dem KINNE-SAFFRAN auch mit vermehrungsfähigen Keimen vergleichend impfte, betragen die Wirksamkeiten 45,3 und 30,2 und befinden sich damit in ähnlicher Relation zueinander wie die von mir erzielten Schutzwirkungen nach Impfung mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten *S. schwarzengrund*-Bakterien. Für die Zusammenfassung der drei Versuche mit abgetöteten *S. newport*-Bakterien erhielt KINNE-SAFFRAN einen Wirkungsindex von 18,8, im Einzelversuch für den inaktivierten Impfstoff 13,8 und für den vermehrungsfähigen

Impfstoff 18, 6. Da die Endmortalität bei den Kontrolltieren in allen Versuchen nur etwa 80 % erreichte, könnte in einer niedrigeren Virulenz der verwendeten Keime die Ursache für den wesentlich besseren Impfschutz nach Impfung mit inaktivierten *S. newport*-Bakterien gesehen werden. In meinen entsprechenden Immunisierungsversuchen mit einem Wirkungsindex von 2, 1 betrug die durchschnittliche Endmortalität der Kontrolltiere 93, 5 %.

Die akut-toxische Infektion durch *S. schwarzengrund* wurde durch die orale Impfung bedeutend besser abgefangen als die nach Infektionsbelastung mit *S. newport* beobachtete Infektion mit langsam ansteigender Absterbekurve. Aus dieser unterschiedlichen Schutzwirkung bei den beiden *Salmonella*-Spezies kann möglicherweise geschlossen werden, daß nach oraler Impfung die antiendotoxische Immunität höher ist als die antiinfektiöse. Sollte aber der Impfschutz nach der oralen Impfung so schnell nachlassen, daß er in der zweiten Phase des Infektionsgeschehens nicht mehr voll wirksam ist, so würde diese Annahme nicht zutreffen, da in dem gewählten Versuchsablauf die antiendotoxische Immunität eher geprüft wird als die antiinfektiöse.

In ihren Mäuseschutzversuchen mit oraler Immunisierung gegen *Dyspepsiecoli*-Infektionen und intraperitonealer Belastung erhielten LIETZ und RAETTIG nach spezifischer Impfung mit hitzeinaktivierten Keimen einen hochwertigen Schutz gegenüber der homologen Infektion, der einen Wirkungsindex von 73, 6 der gesamten Versuchsreihe ausmachte (50). Auch die *Coli*-Infektion führte bei den Mäusen zu einer schweren toxischen Erkrankung mit ähnlichem Verlauf wie die oben beschriebene Infektion nach *S. schwarzengrund*, wodurch meine Vermutung bestätigt wird, daß die antiendotoxische Immunität nach der oralen Impfung sehr hoch ist und daher Erreger vom akut-toxischen Infektionstyp besonders wirk-

sam abgefangen werden können. Die Versuche von LIETZ und RAETTIG brachten einen weiteren Beweis dafür, daß die von BESREDKA lange Zeit vertretene Meinung der lokalen Darm-Immunität nach oraler Impfung nicht zutreffen kann; denn auch in dieser Versuchsreihe war nach parenteraler Injektion der virulenten Keime eine gut belastbare Immunität nachweisbar.

Die gruppenspezifische Immunisierung mit *S. schwarzengrund*, die mit *S. heidelberg* belastet wurde, erreichte entsprechend den beiden verschiedenen Impfstoffen Wirksamkeiten von 14,6 und 13,4. Die Leistung dieser Impfung fiel somit gegenüber der spezifischen auf einen Index von 30 bzw. 44 ab. KINNE-SAFFRAN erzielte in ihren spezifischen Immunisierungsversuchen mit *S. heidelberg* durch Verwendung eines vermehrungsfähigen Impfstoffs eine Wirksamkeit von 81,4. Nach Impfung mit hitzeinaktivierten Keimen betrug der Wirkungsindex immerhin noch 46,6. Die spezifische Impfung mit *S. heidelberg* war also erheblich wirksamer als die von mir geprüfte spezifische Schutzwirkung nach Impfung mit *S. schwarzengrund*. Nach gruppenspezifischer Belastung fiel die Leistung bei den mit vermehrungsfähigen *S. schwarzengrund*-Bakterien geimpften Mäusen auf weniger als ein Drittel der spezifischen Impfung ab, obgleich beide *Salmonella*-Spezies von ihren vier Körperantigenen drei gemeinsam besitzen, die offenbar nur einen geringgradigen übergreifenden Schutz bewirken konnten. Auffällig ist aber, daß dieser Schutz nach Verfütterung von abgetöteten *S. schwarzengrund*-Bakterien nicht wesentlich niedriger war.

Die Abhängigkeit des Impferfolges von der serologischen Spezifität der O-Antigene der verwendeten *Salmonella*-Spezies wird am zweiten Versuchsmodell mit oraler Immunisierung durch *S. newport*-Bakterien und gruppenspezifischer Belastung durch *S. blockley* noch deutlicher. Da beide Arten in ihren somatischen Antigenen völlig übereinstimmen, wurde nach Impfung mit vermehrungsfähigen Bak-

terien ein Leistungsindex von 94 und somit ein nahezu gleichwertiger Impfschutz erreicht. Der hitzeinaktivierte Impfstoff war bei gruppenspezifischer Belastung sogar noch etwas wirksamer als bei spezifischer Impfung. Ein Vergleich zur spezifischen Impfung mit *S. blockley* von KINNE-SAFFRAN zeigt für einen Einzelversuch mit Impfung von vermehrungsfähigen Bakterien einen Wirkungsindex von 82, 2 und für den abgetöteten Impfstoff eine Wirksamkeit von 39, 8 an (39). Die gruppenspezifische Impfung war also aufgrund der gemeinsamen O-Antigene noch gut wirksam.

Die beiden *Salmonella*-Arten *S. schwarzengrund* und *S. newport* aus den Gruppen B und C/2 unterscheiden sich im Aufbau ihrer Körper- und Geißelantigene in beiden Phasen, doch gehören sie nach KAUFFMANN (38) beide demselben Chemotyp XIV an. Sie besitzen also qualitativ die gleiche Zusammensetzung ihrer Polysaccharide, die als Träger der antigenen Eigenschaften angesehen werden. Wäre also die unspezifische Komponente der oralen Immunisierung an die Zuckerbausteine gebunden, so wäre ein Impferfolg durch Austausch des immunisierenden Keimes durchaus denkbar. Die Versuchsergebnisse zeigen aber, daß durch Kreuzung von *S. schwarzengrund* und *S. newport* keine echte Immunität erzielt wurde. Die Impfung mit inaktiviertem Bakterien-Antigen war bei unspezifischer Belastung völlig wirkungslos. Dagegen war ein kleiner Teil der Tiere nach Verimpfung von vermehrungsfähigen Bakterien geschützt. Offenbar hatten hier die bewegungs- und vermehrungsfähigen Keime eine Steigerung der unspezifischen Abwehr bewirkt, die gegen die heterologen Keime wirksam war.

LIETZ und RAETTIG, die ebenfalls am Modell der intraperitonealen Infektion mit *Dyspepsiecoli*-Bakterien im Vergleich zur spezifischen Impfung mit einem heterologen Stamm unspezifisch belastet hatten, erhielten bei der unspezifischen Impfung einen Leistungsabfall auf 32 % (50). Bei den mit *Salmonellen* geimpften Mäusen meiner Ver-

suchsreihe fiel die Leistung bei gruppenspezifischer Belastung gegenüber den spezifisch geimpften Tieren auf 30, 44 bzw. 94 ab. Bei unspezifischer Belastung war die Leistung nach Impfung mit hitzeabgetöteten Keimen 0. Nach oraler Verimpfung von virulenten Erregern betrug sie aber noch 32 % bzw. 24 % des spezifischen Impferfolges. Die Schutzwirkung war also entweder durch gemeinsame somatische Antigene verursacht oder durch pathogenetische Eigenschaften der virulenten Keime bedingt.

### 3. Erörterung der Lokalisation der nach oraler Impfung unspezifisch schützenden Komponente

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte ich keinen breiten unspezifischen Impfschutz feststellen, wie ihn RAETTIG (76) am Modell der oralen Infektion mit *S. typhi* murium beobachtet hatte. Daraus ist zu folgern, daß der nach oraler Immunisierung durch intraperitoneale Belastung geprüfte Schutz wesentlich spezifischer ist als der nach oraler Infektionsbelastung. RAETTIG hatte nach oraler Impfung mit völlig nichtverwandten Antigenen nur einen Leistungsabfall auf 86, 74 bzw. 54 % der spezifischen Impfung gehabt. Durch orale Infektionsbelastung war also ein erheblich größerer unspezifischer Impfschutz nachweisbar als am Modell der intraperitonealen Infektion.

Mit diesen Ergebnissen stimmen die Befunde von JANDL (37) überein, der in Mäuseschutzversuchen nach oraler Immunisierung mit Impfstoffen von *S. typhi* (W-Form), *S. anatum* und *E. coli* die nachfolgende Infektion mit *S. enteritidis* oral oder parenteral durchführte. Dabei ergab sich, daß die Mäuse gegen die orale Infektion geschützt waren, gegen die parenterale Infektion aber nur die mit *S. typhi* geimpften aufgrund ihrer gemeinsamen O-Antigene mit *S. enteritidis*. Der unspezifische Schutz, der von allen drei Impfstoffen ausging und gegen die orale Infektion wirksam war, mußte also als lokale Darm-Immunität aufgefaßt werden.

JANDL bestätigt also die von LIETZ und mir beobachtete Tatsache, daß durch eine parenterale Infektion nur die spezifische Immunität getestet wird. Dagegen wirkt einer oralen Belastung eine hohe unspezifische Schutzkomponente in der Darmwand entgegen, die bei der intraperitonealen Infektion umgangen wird. Durch den Kontakt mit immunisierenden Erregern scheint die Darmschleimhaut zur Schutzschicht zu werden, die auch gegen das Eindringen heterolo-

ger Bakterien zu schützen vermag.

Die Frage nach der Antigenabhängigkeit der unspezifischen Schutzkomponente nach oraler Immunisierung konnte von mir in dieser Versuchsreihe nicht beantwortet werden, da der erzielte Impfschutz weitgehend spezifisch war. Doch bestätigen vor allem die tierexperimentellen Ergebnisse von JANDL RAETTIG's Ansicht, daß für das Zustandekommen des unspezifischen Schutzes nicht die Antigene selbst, sondern die pathogenetischen Eigenschaften der Erreger entscheidend sind.

Es wird nun in kommenden Experimenten geklärt werden müssen, in welcher Weise die Darmschleimhaut befähigt ist, unspezifische Abwehrstoffe zu bilden und durch welche Elemente der Bakterienzelle beim Kontakt mit der Darmwand die Synthese von Schutzstoffen ausgelöst wird. Durch geeignete Immunisierungsverfahren mit radioaktiv markierten oder mit Farbstoff versehenen Bakterien-Antigenen müßte es möglich sein, genaue Lokalisation und Wirkungsmechanismus der unspezifischen Abwehrkomponente zu erforschen.

Abschließend läßt sich feststellen, daß eine orale Impfung gegenüber einer natürlichen, oralen Infektion breiter unspezifisch wirkt als gegenüber einer parenteralen. Für die Planung einer oralen Immunprophylaxe gegen die Salmonella-Infektionen ist also von Bedeutung, daß bei der Impfstoffherstellung nicht alle Salmonellen der Enteritis-Gruppe berücksichtigt zu werden brauchen.

## V. Zusammenfassung

In zwei Versuchsgruppen wurden weiße Mäuse mit vermehrungsfähigen und hitzeinaktivierten Salmonellen oral geimpft. Nach Verfütterung von *S. schwarzengrund*-Antigen war anhand der intraperitonealen spezifischen Infektionsbelastung bei etwa einem Drittel der geimpften Versuchstiere ein wirksamer Impfschutz festzustellen, der durch Verimpfung von vermehrungsfähigen *S. schwarzengrund*-Bakterien aber noch erheblich gesteigert wurde. Gegenüber einer intraperitonealen Infektion mit virulenten *S. newport*-Stämmen waren die mit *S. newport*-Antigen vorbehandelten Tiere nicht geschützt, wohl aber ein Drittel der Immuntiere nach oraler Impfung mit vermehrungsfähigen *S. newport*-Bakterien.

Um die Spezifität der oralen Immunisierung zu prüfen, wurden zur intraperitonealen Infektionsbelastung außer der spezifischen Spezies verwandte *Salmonella*-Arten aus derselben und einer benachbarten Gruppe des Kauffmann-White-Schemas verwendet. Der partiell auch bei nicht-erregerspezifischer Infektion beobachtete Impferfolg war allein abhängig von den gemeinsamen O-Antigenen der immunisierenden und infizierenden Keime. Ein geringgradiger unspezifischer Schutz wurde nur nach Verimpfung von vermehrungsfähigen, virulenten Salmonellen festgestellt.

In Übereinstimmung mit den Mitteilungen anderer Autoren wird die unspezifische Wirkung der oralen Immunisierung als lokale Darm-Immunität gedeutet.



VI. Schrifttum

1. von Behring, E. und Nissen, F.: Zschr. f. Hyg. 8, 412 (1890)
2. von Behring, E. und Kitasato: Dtsch. med. Wschr. 16, 1113 (1890)
3. Berliner, M. und Citron, S.: Dtsch. med. Wschr. 46, 997 (1920)
4. Besredka, A.: Die lokale Immunisierung, Verlag J.A. Barth, Leipzig 1926
5. Bieling, R.: Klin. Wschr. 2, 1245 (1923)
6. Bonhoff: Arch. f. Hyg. 22, 28 (1895)
7. Brandis, H.: Ergeb. d. Hyg. 28, 141 (1954)
8. Buchner, H.: Arch. f. Hyg. 10, 84 (1890)
9. \_\_\_\_\_ Münchn. med. Wschr. 38, 841 (1891)
10. \_\_\_\_\_ Hyg. Rundschau 1, 653 (1891)
11. \_\_\_\_\_ Zbl. f. Innere Med. 14, 35 (1893)
12. \_\_\_\_\_ Zbl. f. Innere Med. 15, 932 (1894)
13. Calmette, A.: Ann. de l'institut Pasteur 9, 225 (1895)
14. Dresel, E.G. und Keller, W.: Zschr. f. Hyg. 97, 151 (1923)
15. \_\_\_\_\_ und Freund, H.: Arch. f. experim. Path. und Pharm. 91, 317 (1921)
16. Delius, W. und Kolle, W.: Zschr. f. Hyg. 24, 327 (1897)
17. Dieudonné, A.: Wien. Klin. Wschr. 2, 575 (1906)
18. Doerr, R. und Seidenberg, S.: Zschr. f. Hyg. 119, 135, (1937)
19. Emmerich, R.: Arch. f. Hyg. 6, 442 (1887)
20. \_\_\_\_\_ und die Mattei, E.: Fortschr. d. Med. 5, 653 (1887)

21. \_\_\_\_\_ Münch. med. Wschr. 38, 339 (1891)
22. \_\_\_\_\_ Münch. med. Wschr. 1894, 549
23. \_\_\_\_\_ und Löw: Zbl. f. Bakt. I. 25, 33 (1899)
24. Enderlen, E.: Münch. med. Wschr. 38, 235 (1891)
25. Erzin, N.: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 138, 443, (1937)
26. Fleckseder, R.: Wien. Klin. Wschr. 19, 637 (1916)
27. Fraenkel, C. und Sobernheim, G.: Hyg. Rundschau 4, 97, 145, (1894)
28. Fraenkel, C.: Hyg. Rundschau 4, 577 (1894)
29. Friedberger, E.: Berl. Klin. Wschr. 41, 242 (1904)
30. Gruber, M.: Zbl. f. Inn. Med. 17, 442 (1896)
31. \_\_\_\_\_ und Durham, H. E.: Münchn, med. Wschr. 43, 285 (1896)
32. Hueppe, F.: Berl. Klin. Wschr. 29, 409 (1892)
33. \_\_\_\_\_ Berl. Klin. Wschr. 31, 395, 427, (1894)
34. \_\_\_\_\_ und Wood, G. C.: Berl. Klin. Wschr. 26, 347, (1889)
35. Issaeff: Zschr. f. Hyg. 16, 287 (1894)
36. Jaggi, M.: Zschr. f. Immunforschg Orig. 36, 482 (1922)
37. Jandl, G.: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 198, 179 (1965)
38. Kauffmann, F.: Die Bakteriologie der Salmonella-Spezies,  
bei E. Munksgaard - Kopenhagen 1961
39. Kinne-Saffran, E.: Inaug. Diss. FU Berlin 1967
40. Klein, E.: Brit. Med. Journal 1893, Vol. 1, 632
41. \_\_\_\_\_ Zbl. f. Bakt. I 16, 950 (1894)
42. Klemperer, G.: Berl. Klin. Wschr. 29, 789 (1892)
43. \_\_\_\_\_ Hyg. Rundschau 4, 654 (1894)
44. \_\_\_\_\_ Zschr. f. Klin. Med. 25, 449 (1894)

45. \_\_\_\_\_ und Klemperer, F.: Berl. Klin. Wschr. 29, 421 (1892)
46. Kolle, W. und Prigge, H.: Hdb. d. path. Mikroorganismen  
1, 1; 565, 607 (1929)
47. Koller, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer  
Zahlen, Dresden und Leipzig 1940
48. Kondratieff, J.: Zbl. f. Inn. Med. 17, 1282 (1896)
49. Lange, B.: Zschr. f. Hyg. 94, 135 (1921)
50. Lietz, B. und Raettig, H.: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 204, 543 (1967)
51. Löffler, F. und Abel, R.: Zbl. f. Bakt. I. 19, 51 (1896)
52. Löhr, H.: Zschr. f. ges. Med. 1921, 57
53. Madsen, T.: Med. Klin. 20, 990 (1924)
54. Magrassi, F.: Zschr. f. Hyg. 117, 573 (1936)
55. Matsuda, T.: Zschr. f. Immunforschg. 41, 44 (1924)
56. Melczer, N. und Dahmen, O.: Zschr. f. Immunforschg.  
. 52, 469 (1927)
57. Meyer: Zbl. f. Inn. Med. 16, 1012 (1895)
58. Morgenroth, J. und Biberstein, H. und Schnitzer, R.: Dtsch.  
med. Wschr. 46, 337 (1920)
59. Morgenroth, J. und Abraham, L.: Zschr. f. Hyg. 94, 163 (1921)
60. Neisser, E.: Zschr. f. Klin. Med. 23, 93 (1893)
61. Oerskov, J.: Zschr. f. Immunforschg. 98, 359 (1940)
62. \_\_\_\_\_ und Kauffmann, F.: Zschr. f. Hyg. 119, 65 (1937)
63. van Oye, E.: The world problem of salmonellosis  
bei Dr. W. Junk Publishers - The Hague - 1964
64. Pawlowsky, A. D.: Virchows Arch. f. path. Anatomie 108,  
494 (1887)
65. \_\_\_\_\_ Zbl. f. allgem. Path. u. path. Anatomie 5, 411 (1894)

66. Pfeiffer, R.: Zschr. f. Hyg. 16, 268 (1894)
67. \_\_\_\_\_ Zschr. f. Hyg. 19, 75 (1895)
68. \_\_\_\_\_ Zschr. f. Hyg. 20, 198 (1895)
69. \_\_\_\_\_ und Issaëff: Zschr. f. Hyg. 17, 355 (1894)
70. \_\_\_\_\_ und Kolb, W.: Zbl. f. Inn. Med. 17, 657, (1896)
71. Prausnitz, C. und Meißner, G.: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 94,  
376 (1925)
72. Pickert, H.: Klin. Wschr. 1948, 400
73. Raettig, H.: Typhusimmunität und Schutzimpfung  
Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1952
74. \_\_\_\_\_ Zbl. f. Bakt. I. Ref. 183, 1 (1962)
75. \_\_\_\_\_ Zbl. f. Bakt. I. Orig. 193, 398 (1964)
76. \_\_\_\_\_ Zbl. f. Bakt. I. Orig. 197, 368 (1965)
77. Reploh, H. und Otte, H. J.: Lehrbuch der medizinischen  
Mikrobiologie, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart,  
1965
78. Roemer, F.: Wien. Klin. Wschr. 4, Nr. 45 (1891)
79. Rolla, C.: Zbl. f. Bakt. I. Ref. 45, 313 (1910)
80. Rostoski: Dtsch. med. Wschr. 31, 691 (1905)
81. Roux, E.: Ann. de l'institut Pasteur 8, 722 (1894)
82. \_\_\_\_\_: Ann. de l'institut Pasteur 2, 49 (1888)
83. Rumpf, T.: Dtsch. med. Wschr. 19, 987 (1893)
84. Sanarelli, J.: Ann. de l'institut Pasteur 8, 193 (1894)
85. \_\_\_\_\_ Ann. de l'institut Pasteur 9, 129 (1895)
86. Schnitzer, R. und von Kühlewein, M.: Zschr. f. Hyg. 92, 492
87. Sergent, E. und Parrot, L. und Donatien, A.: Med. Welt 8,  
1455 (1934)

88. Shibuya, S.: Zbl. f. ges. Hyg. 26, 119 (1932)
89. Sobernheim, G.: Hyg. Rundschau 3, 997 (1893)
90. \_\_\_\_\_ Zschr. f. Hyg. 20, 438 (1895)
91. \_\_\_\_\_ Zschr. f. Hyg. 25, 301 (1897)
92. Tsukahara, J.: Zschr. f. Immunforsch. Orig. 32, 410 (1921)
93. Torikata, R. und Imaizumi, M.: Zschr. f. Immunforsch.  
Orig. 94, 342 (1938)
94. Voges, O.: Zschr. f. Hyg. 17, 474 (1894)
95. Walbum, L.E.: Dtsch. med. Wschr. 51, 1188 (1925)
96. Weichardt, W.: Hdb. d. path. Mikroorganismen 1, 2; 1147 (1929)
97. \_\_\_\_\_ und Schrader, E.: Münchn. med. Wschr. 66, 289 (1919)
98. Westbrook, F. F.: Hyg. Rundschau 4, 823 (1894)
99. \_\_\_\_\_ und Kanthack, A. A.: Brit. Med. Journal 1893, 2, 572
100. Wooldridge: aus Du Bois - Reymonds' s Archiv f. Physiologie  
1888, 526
101. Yoshida, E.: Arch. f. Hyg. 69, 21 (1909)



An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof.  
Dr. med. H. Raettig für die freundliche Überlas-  
sung des Themas und die großzügige Unterstützung  
und Beratung während der Durchführung der Ar-  
beit bedanken.

## Lebenslauf

Am 21. Oktober 1941 wurde ich, Eva-Maria Kurschilgen geb. Formella, als Tochter der Eheleute Albert Formella und Irene Formella geb. Anhut in Perleberg, Kreis Westprignitz, geboren. Ich bin das jüngste von fünf Kindern. Mein Vater ist Justizinspektor im Ruhestand.

Ich wurde im Herbst 1948 in die Perleberger Mädchenschule eingeschult, der ich bis zur Übersiedlung der Familie nach Berlin im Jahre 1951 angehörte. In Berlin-Spandau besuchte ich dann die 2. Grundschule, von der ich 1952 auf die 1. Grundschule als Vorstufe für das Kant-Gymnasium in Berlin-Spandau umgeschult wurde. Ab 1954 war ich Schülerin dieses Gymnasiums, auf dem ich 1961 die Reifeprüfung ablegte. Im selben Jahr begann ich mit dem Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, bestand dort an der Medizinischen Fakultät 1962 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, 1964 die Ärztliche Vorprüfung und 1968 das Staatsexamen.



